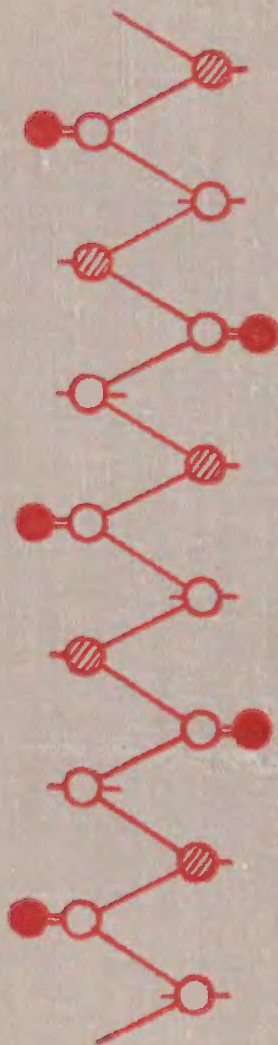


АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ

Т. Дэвени Я. Гергей



Amino Acids, Peptides and Proteins

BIOCHEMICAL AND IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES
IN PROTEIN CHEMISTRY

by

T. Dévényi, Ph.D., D.Sc.
Enzymology Department, Institute of Biochemistry
Hungarian Academy of Sciences, Budapest

and

J. Gergely, M.D., D.Sc.
Professor of Immunology
Department of Immunochemistry, National Institute
of Haematology and Blood Transfusion, Budapest

Elsevier Scientific Publishing Company
Amsterdam — London — New York
1974

Т. Дэвени, Я. Гергей

АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ

Перевод с английского
канд. мед. наук А. Н. МАЦА

Под редакцией и с предисловием
д-ра биол. наук Р. С. НЕЗЛИНА

Издательство «Мир»
Москва 1976

Методическое руководство по биохимии и иммунохимии белка. Рассмотрены теоретические основы методов и современная аппаратура для гель-фильтрации, бумажной, ионнообменной и тонкослойной хроматографии, в том числе методы количественного аминокислотного анализа с помощью автоматических анализаторов. Подробно описан анализ производных аминокислот методом газовой хроматографии. Книга хорошо иллюстрирована и снабжена подробной библиографией.

Предназначена для химиков, врачей-лаборантов, биохимиков, а также для биологов других специальностей (молекулярных биологов, вирусологов, физиологов, цито- и гистохимиков и т. п.).

Редакция биологической литературы

© 1974 Akadémiai Kiadó, Budapest

Д $\frac{21005-000}{041(01)-76}$ — 000—76 © Перевод на русский язык, «Мир», 1976

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Огромные успехи молекулярной биологии в значительной степени обусловлены быстрым развитием биохимических методов. Среди них особо важное место занимают те методические приемы, которые были разработаны для изучения свойств и строения белков, и не будет большим преувеличением сказать, что именно они являются методическим фундаментом современной биохимии.

Авторы данной книги, известные венгерские биохимики Т. Дэвени и Я. Гергей со своими сотрудниками поставили перед собой вполне конкретную задачу — обсудить чаще всего применяемые и хорошо апробированные методы исследования белков, пептидов и аминокислот, а также дать конкретное описание практических приемов, используемых в биохимическом и иммунохимическом анализе. Авторы не стремились привести описание всех разработанных к настоящему времени методов, они выделили лишь важные и наиболее распространенные.

Необходимо отметить, что одной из положительных черт данной книги является широкое использование при изложении материала богатого собственного опыта авторов. Почти все описанные методы прошли апробацию в их лабораториях. Изложение построено весьма рационально — вслед за строгим описанием метода идут более или менее подробные комментарии, подчеркивающие его достоинства и недостатки. Наконец большую ценность книге придает подробное изложение иммунохимических методик, которые находят все большее применение при изучении белков. Нет сомнений, что настоящее руководство окажет большую помощь в исследовательской и практической работе биологам и медикам самых различных специальностей.

Р. Незлин

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРОВ

В последние два десятилетия наблюдается очень быстрое развитие белковой химии. Методические возможности исследователей значительно расширились благодаря усовершенствованию аналитических методов и главным образом внедрению принципиально новых методов, таких, как хроматография, электрофорез, определение концевых групп и иммунохимический анализ.

Эти методы используются не только в теоретической химии белка и биохимии; в настоящее время без них немыслима работа в научно-исследовательских и клинических лабораториях.

В этой книге мы излагаем принципы и даем подробные описания наиболее важных методов, которые могут быть использованы в лабораториях, оснащенных общедоступными приборами и реактивами. Нам хотелось бы содействовать широкому внедрению рассматриваемых методов, поэтому мы уделили особое внимание практическим моментам.

Наряду с методами химического анализа аминокислот, пептидов и белков в книге подробно изложены методы иммунохимического анализа. Однако в ней затронуты далеко не все вопросы: очень многие методические аспекты не рассматриваются из-за ограниченного объема издания или из-за отсутствия собственного опыта. Но мы искренне надеемся, что, несмотря на неизбежные недостатки, эта книга окажется полезной исследователям, работающим как в области химии, так и медицины.

Т. Дэвени
Я. Гергей

Глава I

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ АНАЛИТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

А. ИЗУЧЕНИЕ НАТИВНЫХ БЕЛКОВ

Быстрое развитие ряда отраслей биологии началось всего лишь сто лет назад. Примерно тогда же было начато систематическое изучение белков, представляющее собой в известной мере более трудную задачу, чем, например, решение некоторых проблем физиологии или фармакологии. Основная трудность в изучении белка заключается в том, что объект исследования представляет собой очень большую и, по-видимому, чрезвычайно лабильную молекулу с исключительно сложной структурой. Поэтому разработка методов выделения и изучения нативных, неденатурированных белков происходила довольно медленно. Однако в последние два десятилетия, когда разработка методов анализа белков вступила в фазу быстрого и всестороннего развития, белковая химия сделала гигантский шаг вперед. Среди выдающихся достижений последних 10—15 лет видное место занимает расшифровка первичной структуры ряда белков. Вместе с тем и сейчас изучение структуры любого сколь угодно сложного белка является весьма серьезной задачей.

В последние годы благодаря развитию аналитических методов изучение нативных белков приобретает все возрастающее значение как в химических, биохимических и медицинских исследованиях, так и в клинической практике. В книге, целью которой является детальное описание методов анализа белка, было бы затруднительно давать подробный обзор результатов, полученных при использовании того или иного метода, и вполне естественно, что этого нельзя требовать от руководства, предназначенного для определенных практических задач. Мы решили, что будет наиболее целесообразным на тщательно подобранных примерах проиллюстрировать возможности и ограничения того или иного аналитического метода.

Хорошим примером изучения нативных белков является исследование белков сыворотки крови, включающее их выделение, очистку, количественный и качественный анализ. Широкое применение методов анализа белков будет показано нами именно на примере изучения сывороточных белков.

Открыв весьма широкие перспективы анализа белков вообще, разнообразные методы электрофоретического и иммунохимического

го исследования, а также хроматография и гель-фильтрация позволили в то же время обнаружить ряд новых белков сыворотки. Это в свою очередь не только способствовало выяснению деталей некоторых физиологических и патофизиологических процессов, но в значительной степени стимулировало изучение основных иммунологических явлений, расшифровку структуры белков и т. д. Разумеется, приводимые нами материалы о белках сыворотки нельзя считать исчерпывающими. Мы стремились познакомить читателя лишь с теми возможностями, которые открывает каждый из описанных методов, и надеемся, что настоящее руководство окажется полезным при выборе наиболее подходящего метода, а также при интерпретации полученных результатов для исследователей, работающих как с сывороточными, так и с другими белками.

В 1878 г. Хаммарстену удалось с помощью высаливания насыщенным сульфатом магния отделить глобулины от альбуминов сыворотки. Это открытие резко изменило существовавшее тогда представление о сывороточных белках. Применение сульфата магния положило начало целой серии *методов фракционирования белков путем высаливания*. В течение нескольких десятилетий процедура высаливания была единственно доступной как в клинических, так и в научных исследованиях белков крови. На этом этапе сывороточные белки крови были охарактеризованы по их растворимости в воде и в растворах солей разной концентрации. На основании этих данных стали различать нерастворимую в воде фракцию — *зуглобулин* и растворимые — *псевдоглобулин* и *альбумин*.

Классическое определение глобулинов сыворотки связано с высаливанием ее сульфатом аммония, поскольку глобулинами называют белки, выпадающие в осадок при полунасыщении сыворотки этой солью.

Фракционирование белков высаливанием не свободно от недостатков. Оно не дает достаточно четкого разделения индивидуальных компонентов смеси. Концентрации солей, осаждающие ту или иную фракцию белков нормальной сыворотки, могут отличаться от концентраций, необходимых для фракционирования сывороток, содержащих «патологические» белки и т. д. Несмотря на это, до сих пор высаливание широко используется в клинических лабораториях для разделения глобулинов и альбумина, так как этот прием является относительно простым и быстрым способом определения альбумин-глобулинового коэффициента (А/Г-коэффициент).

1. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НАТИВНЫХ БЕЛКОВ

При физиологических условиях общее содержание белка в сыворотке, а также А/Г-коэффициент варьируют в очень узких пределах. Отклонение от физиологической нормы указывает на наличие патологического процесса. Определение А/Г-коэффициента

высаливанием все больше теряет свое значение, так как результат, полученный этим методом, — всего лишь грубый показатель количественных и качественных изменений множества сывороточных белков, выполняющих самые разнообразные функции. Содержание некоторых белковых фракций может увеличиваться или уменьшаться, они могут вовсе отсутствовать в сыворотке, но это в ряде случаев не отражается ни на общем содержании белка, ни на А/Г-коэффициенте.

Введение Тизелиусом *электрофоретического анализа* следует рассматривать как начало нового весьма значительного направления в изучении белков сыворотки.

Электростатический заряд белковых молекул в зависимости от рН среды может быть положительным или отрицательным, поэтому в электрическом поле молекулы движутся либо к аноду (*анафорез*), либо к катоду (*катафорез*). Это явление Тизелиус использовал для разделения отдельных компонентов смеси белков, в частности для изучения белковых фракций сыворотки крови.

При так называемом *свободном электрофорезе* (электрофорезе с подвижной границей), разработанном Тизелиусом, скорость и направление миграции разных белковых компонентов под влиянием электрического поля в U-образном сосуде, содержащем буферный раствор, целиком обусловлены зарядом их молекул. Скорость миграции частицы в электрическом поле определяется как расстояние, пройденное ею в единицу времени на единицу градиента напряжения. Следовательно, каждый из компонентов смеси белков можно выделить и охарактеризовать его скорость миграции.

Метод высаливания, как известно, позволяет разделить сыворотку на три фракции: альбумин, эглобулин и псевдоглобулин. С введением электрофореза стало возможным выделять для повседневного клинического анализа по меньшей мере пять белковых фракций сыворотки: альбумин, α -1-, α -2-, β - и γ -глобулины.

Здесь необходимо также упомянуть об *ультрацентрифугировании*, которое внесло весьма значительный вклад в современные представления о белках сыворотки. С введением центрифугирования смеси белков в высокоскоростной центрифуге, впервые созданной Сведбергом, появилась возможность осаждать определенные белки и тем самым разделять смесь на компоненты, имеющие разную величину молекул. Этим методом можно определять гомогенность и молекулярный вес белков, а также выделять некоторые белки из смеси.

Электрофорез позволил установить нормальное процентное содержание белковых фракций сыворотки и выяснить значение его отклонений от нормы. Он обусловил появление таких клинически важных понятий, как диспротеинемия и парапротеинемия. *Диспротеинемией* называют нарушение относительного содержания встречающихся в норме белковых фракций сыворотки без появле-

ния «патологических» белков. *Парапротеинемия* означает появление в крови «патологических» белков.

Комбинированное применение методов Тизелиуса и Сведберга способствует выделению более однородных белковых фракций и позволяет получать более точные характеристики их молекулярных весов и скоростей миграции.

2. МЕТОД ЗОНАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Оборудование для свободного электрофореза и ультрацентрифугирования достаточно дорого и сложно по своему устройству, что ограничивает широкое применение этих методов. Поэтому возникла идея замены свободного электрофореза (электрофоретического разделения белков в растворе) электрофорезом в специальной *поддерживающей среде*, который основан на том же принципе, но намного проще в осуществлении.

Поддерживающей средой для электрофореза могут служить фильтровальная бумага, крахмальный или агаровый гели, ацетат-целлюлозная мембрана, полиакриламидный гель и т. д. Создаваемое в смоченной буферным раствором поддерживающей среде электрическое поле заставляет различные компоненты смеси белков двигаться в определенном направлении со скоростью, соответствующей заряду молекул, что приводит к их разделению. Если электрофорез происходит в крахмальном или полиакриламидном геле, то разделение зависит не только от заряда, но и от величины и формы молекул, так как в этом случае поддерживающая среда выполняет роль молекулярного сита. При электрофорезе в щелочном буферном растворе белки сыворотки крови разделяются по меньшей мере на 5 фракций. При ионной силе 0,1 и рН 8—9 быстрее всех к аноду движется альбумин. За ним следуют в порядке уменьшения скорости миграции α -1-, α -2-, β - и γ -глобулиновые фракции. Подбирая соответствующую поддерживающую среду и буферный раствор, можно улучшить разделение. Поэтому даже в сравнительно малооснащенной больничной или клинической лаборатории зональный электрофорез позволяет проанализировать белки более детально, чем свободный.

Преимущества методов зонального электрофореза в сравнении с методами свободного электрофореза заключаются в следующем:

1. Все они значительно проще в осуществлении.
2. Необходимое количество исследуемого материала весьма мало. Например, для электрофореза на бумаге требуется 0,5—0,8 мг белка, а для электрофореза в полиакриламидном геле — всего 100—200 мкг. В то же время свободный электрофорез даже в аппаратах для микро- или полумикроанализа требует значительных количеств сыворотки. Это является одной из причин, по которым задерживается широкое использование свободного электрофореза

в повседневной работе клинических лабораторий. Благодаря малому количеству белка, требующемуся для исследования методом зонального электрофореза, появилась возможность ставить практически неограниченное число анализов белков сыворотки. Зональный электрофорез широко используется для анализа белков в педиатрической практике и при исследовании материалов с низкой концентрацией белка (например, спинномозговая и тканевая жидкости), не говоря уже о чрезвычайно широком использовании этого метода в экспериментальных исследованиях на животных. Поскольку для опытов требуются лишь очень небольшие количества исследуемого материала, можно ставить сколько угодно параллельных проб, что в значительной мере повышает точность исследования.

3. После электрофоретического разделения белковые фракции можно фиксировать в поддерживающей среде и выявить с помощью специфического окрашивания. Среди многочисленных методов окрашивания особое значение в клинических исследованиях приобрели способы выявления связанных с белками липидных и углеводных компонентов. Благодаря простоте этих методов анализ липопротеидов и гликопротеидов стал обычным в повседневной клинической практике. Он приобрел большое значение в диагностике некоторых заболеваний, а это позволило значительно продвинуться в выяснении их патогенеза. Специальные методы окрашивания помогают также обнаружить трансферрин, гаптоглобин, церулоплазмин и другие компоненты сыворотки.

4. Число фракций, на которые разделяется исходный белок при зональном электрофорезе, можно увеличить не только с помощью специальных методов окрашивания. Простая замена буферного раствора или поддерживающей среды дает тот же эффект. Например, при электрофорезе сыворотки на бумаге в буферном растворе трис-ЭДТА получается не пять, а девять белковых фракций [1]. Еще лучшее разделение можно получить в поддерживающей среде, которая обладает эффектом молекулярного сита, например в крахмальном или полиакриламидном гелях. Малые размеры пор этих гелей задерживают миграцию высокомолекулярных белков, так как трение при этом увеличивается настолько, что даже большой электростатический заряд их молекул не может компенсировать замедляющего действия поддерживающей среды. Однако в других поддерживающих средах величина белковой молекулы мало влияет на скорость миграции, поскольку эффект увеличения трения обычно компенсируется ее большим электростатическим зарядом.

5. При зональном электрофорезе разделение белковых фракций происходит очень быстро. Некоторые методы позволяют закончить всю процедуру, включая окрашивание, за 1—2 ч [7].

6. Прибор для зонального электрофореза имеет простое устройство и может быть изготовлен даже в небольшой мастерской. Стоимость такого самодельного или имеющегося в продаже прибора зна-

чительно ниже цены аппарата для свободного электрофореза.

7. Кроме обычного окрашивания, белки, меченные радиоактивным изотопом, после разделения зональным электрофорезом можно выявлять радиоавтографически. Большое значение имеет также тот факт, что с помощью соответствующих субстратов можно непосредственно в поддерживающей среде тестировать ферментативную активность полученных белковых фракций.

Метод зонального электрофореза имеет и некоторые недостатки. С его помощью нельзя произвести прямого определения скорости миграции белков. Между исследуемыми белками и поддерживающей средой возможны нежелательные взаимодействия, в результате которых часть белка адсорбируется в среде. Адсорбция происходит сильнее всего на бумаге, менее выражена на ацетат-целлюлозной мембране и практически ничтожна в агаровом геле.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА БУМАГЕ

Бумажный электрофорез является одним из наиболее распространенных способов зонального электрофореза, в котором поддерживающей средой служит специальная фильтровальная бумага. Она должна быть очень гигроскопичной: количество адсорбируемой ею воды обычно в 130—200 раз превышает ее собственный вес. Эти сорта бумаги имеют низкую зольность (55—70 мг на 100 г) и низкое содержание органического азота (10 мг%).

В зависимости от типа приборов электрофорез на бумаге обычно длится от 4 до 16 ч. Если используется общераспространенный буферный раствор Михаэлиса, то белки сыворотки дают 5 четко разграниченных фракций. После фиксации полосы бумаги можно легко обработать красителями, специфичными для белков, липо- или гликопротеидов. Окрашенные полосы можно хранить или, разрезав на участки, элюировать для фотометрического определения каждой фракции. Электрофорез на бумаге хорошо себя зарекомендовал в повседневной работе клинической лаборатории.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В КРАХМАЛЬНОМ ГЕЛЕ

Некоторые методические сложности препятствуют широкому распространению электрофореза в крахмальном геле, несмотря на его весьма большую разрешающую способность. По сравнению с электрофорезом на бумаге электрофорез в крахмальном геле включает дополнительные операции, связанные с приготовлением и гидролизом крахмала, сборкой прибора, окрашиванием и количественным определением полученных фракций. Однако присущий крахмальному гелю эффект молекулярного сита увеличивает разрешающую способность данного метода по сравнению с электрофорезом на бумаге, и поэтому его используют для более тонкого анализа.

Повышенная разрешающая способность электрофореза в крахмальном геле позволяет делить смесь белков на еще большее число компонентов. Вместо 5 классических фракций сыворотки можно получить 8—10 фракций. Более того, с помощью электрофореза в крахмальном геле можно выделить несколько разных компонентов из препарата, который по данным других методов разделения считался гомогенным. Примеры такого рода встречаются при анализе миеломных белков. При электрофорезе на бумаге, ацетат-целлюлозной мембране или в агаровом геле миеломные белки, относящиеся к IgG- и IgA-типам, образуют гомогенные зоны. Однако иногда в сыворотке больного можно обнаружить неоднородные фракции миеломных белков, например в случае мультиклональной миеломы или миеломы с агрегирующим белком IgA. Микрогетерогенность таких миеломных белков хорошо выявляется при электрофорезе в крахмальном геле. Вместо картины гомогенности, которую они дают при других постановках электрофореза, при разделении в крахмальном геле можно видеть несколько четко разграниченных зон [17].

Электрофорез в крахмальном геле имеет не только большое значение при диагностике парапротеинемий: он весьма важен при определении гомогенности нативных белков и полезен при анализе субъединичной структуры молекулы белка. Например, папаиновые фрагменты IgG (Fab, Fc и Fc') или выделенные из него полипептидные цепи (H- и L-цепи) при электрофорезе в крахмальном геле образуют отдельные зоны. Это позволяет сравнивать субъединицы гомогенных IgG (миеломных белков или чистых антител) между собой.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОВОМ ГЕЛЕ

Агаровый гель представляет собой очень удобную поддерживающую среду для зонального электрофореза, так как в 1—1,5%-ном агаровом геле белки мигрируют почти так же, как при свободном электрофорезе. По сравнению с бумажным агаровый электрофорез обеспечивает большую разрешающую способность и более быстрое фракционирование белков. Белки окрашиваются в агаре так же хорошо, как и на бумаге. Более того, прозрачность агарового слоя облегчает непосредственное фотоэлектрическое измерение белков. В агаре белковые фракции делятся весьма четко, без образования «хвостов», что позволяет наносить большие количества белка, не снижая четкости разделения.

Однако приготовление агарового геля является более трудоемкой процедурой, чем соответствующие операции с бумагой. Это несомненно ограничивает широкое использование электрофореза в агаре. Другое затруднение связано с необходимостью подбора подходящего типа агара, так как качество агара влияет на электро-

форетическую подвижность исследуемого материала. Присутствие в поддерживающей среде агаропектина также является отрицательным моментом метода. Содержащийся в агаре кислый агаропектин способен комплексироваться с некоторыми липопротеидами и сильноосновными белками (например, с лизоцимом и слабоподвижным IgG) и замедлять их миграцию. Отрицательный заряд агара является причиной движения катионов буферного раствора и молекул воды по направлению к аноду. При электрофорезе этот «поток» способен увлечь часть белковых фракций. Такого рода эффекты можно ослабить, если нанести исследуемый материал не вблизи катода, а в центре агаровой пластинки. Подобный эффект не наблюдается в очищенной агарозе, на ацетат-целлюлозной мембране и на фильтровальной бумаге.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АЦЕТАТ-ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МЕМБРАНЕ

Сравнительно новой разновидностью зонального электрофореза является электрофорез на ацетат-целлюлозной мембране [6]. Ацетат-целлюлозная мембрана, по-видимому, — очень хорошая поддерживающая среда, уже нашедшая благодаря ряду достоинств широкое применение. Выше мы отмечали, что приготование крахмального и агарового гелей — довольно трудоемкая операция, осложняющая метод. В то же время способы предварительной обработки ацетат-целлюлозной мембраны почти так же просты, как и в случае с фильтровальной бумагой. При этом разделение белков происходит лучше и быстрее, а для анализа достаточно 5—1000 мкг белка, растворенного в объеме 0,1—10 мкл. Как белки, так и гликопротеиды очень хорошо окрашиваются на ацетат-целлюлозной мембране, поэтому она является прекрасной поддерживающей средой с точки зрения количественной оценки этих соединений. Электрофорез на ацетат-целлюлозной мембране позволяет получить больше белковых фракций сыворотки крови, чем электрофорез на бумаге, но меньше, чем электрофорез в крахмальном геле. С помощью электрофореза на ацетат-целлюлозной мембране можно определять весьма малые количества индивидуальных белков, благодаря чему он очень подходит для анализа гомогенности выделенного нативного белка. Ацетат-целлюлозные мембраны могут быть использованы также в опытах по иммунодиффузии, что является еще одним достоинством этого метода электрофореза.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Несмотря на свою короткую историю, электрофорез в полиакриламидном геле уже очень широко используется в самых различных областях биохимии [2, 9]. Поддерживающей средой в этом методе электрофореза служит сополимер акриламидных и метиленбис-

акриламидных мономеров. Метиленовые мостики, сшивая в определенных местах линейные полиакриламидные цепи, создают пористую структуру. Расположенные на равном расстоянии одна от другой амидные группы обеспечивают высокую гидрофильность этой структуры. Полимеризация акриламида может начаться под действием тетраметилэтилендиаминового индикатора и персульфатного катализатора или в результате фотокатализа (под действием света) в присутствии рибофлавина. Благодаря своей пористой структуре полиакриламидный гель обладает эффектом молекулярного сита. Размер пор зависит от концентрации акриламидного мономера (в 7,5 %-ном геле размер поры равен 50 Å). Электрофорез в полиакриламидном геле имеет определенные преимущества перед электрофорезом в крахмальном геле. Его разрешающая способность значительно выше (можно получить свыше 20 фракций белков сывотки), а сам гель более прозрачен, что облегчает непосредственную количественную оценку фракций. Исключительно полезной оказалась одна из форм этого метода, так называемый диск-электрофорез, с помощью которого можно провести анализ очень небольшого количества белка (50—200 мкг).

3. ИЗУЧЕНИЕ НАТИВНЫХ БЕЛКОВ ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Изучение явления специфической преципитации, возникающей при взаимодействии антител с антигенами *in vitro*, в конце прошлого столетия привело к возникновению новой научной дисциплины — иммунохимии, которая включает изучение химических аспектов иммунитета, в первую очередь химии антигенов, антител и их взаимодействия. Высокая чувствительность и специфичность иммунологических реакций позволили применить их с большой пользой для исследования белков. Иммунохимия не только увеличила методические возможности изучения белков, но и создала новое направление их анализа.

ТЕРМИНОЛОГИЯ

Если парентерально (т. е. минуя пищеварительный тракт) ввести в организм животного чужеродные вещества, например белки иной видовой принадлежности или бактерии, то вскоре после одной или нескольких таких инъекций в сыворотке этого животного появятся особые вещества, способные реагировать с введенными белками. Эти вещества получили название *антител*, тогда как факторы, вызывающие их появление, были названы *антигенами*. Антигенность белковой молекулы определяется теми участками образующих ее полипептидных цепей, которые не встречаются

в структуре молекул реципиента (т. е. иммунизируемого животного). Эти участки называют *антигенными детерминантами*.

Если раствор антигена (например, раствор белка) в адекватных пропорциях смешать с сывороткой, содержащей специфические антитела (*иммунной сывороткой*), то в результате реакции образуется *преципитат*, образованный молекулами антигена и антител. Наибольшее разведение иммунной сыворотки, при котором еще происходит реакция преципитации с антигеном, присутствующим в постоянной концентрации, называют *титром* данной сыворотки. Титр отражает ее активность; например, сыворотка с титром 1:25 000 считается в пять раз активнее сыворотки, имеющей титр 1:5000.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О РЕАКЦИЯХ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Реакция преципитации происходит в два этапа, во время которых реагирующие молекулы антигена и антител связываются друг с другом без каких-либо заметных изменений своей исходной химической структуры. Связывание антигена с антителами специфично, причем эта реакция частично или полностью обратима.

На первом этапе реакции преципитации происходит связывание молекул антигена с антителами, но видимых преципитатов не образуется. На втором этапе реакции происходит агрегация возникших ранее комплексов антиген — антитело с образованием больших нерастворимых частиц, видимых невооруженным глазом. Первый этап реакции протекает быстрее, более обратим и специфичен, чем второй.

Главной чертой иммунохимических реакций является высокая специфичность, однако необходимо подчеркнуть, что структурное сходство некоторых белков, а также гетерогенность антител, иногда свойственная сывороткам, при определенных условиях становятся причиной так называемых *перекрестных реакций*. Это означает, что реакция преципитации может в определенной степени зависеть от неспецифических факторов. Однако последнее обстоятельство лишь незначительно ограничивает использование иммунохимических реакций в изучении белков.

В ряде вопросов, например при выяснении родства между белками, при сравнении фракций патологических и нормальных белков и т. д., перекрестные реакции оказывают существенную пользу. Реакции преципитации весьма *чувствительны*. Например, с помощью антисыворотки соответствующего титра можно обнаружить овальбумин в концентрации 1 мкг/мл. В зависимости от используемого метода определения азота в количественной реакции преципитации удастся обнаружить от 75 до 125 мкг антигенного азота.

В некоторых реакциях преципитации количественный анализ образовавшегося преципитата дает абсолютные величины содержания антигена или антител (метод количественной преципитации). Другие реакции позволяют получать лишь относительные величины (определение титра).

Образование преципитата зависит от ряда факторов. Наиболее существенными из них являются *титр иммунной сыворотки, соотношение концентраций антигена и антител, а также видовая принадлежность иммунной сыворотки.*

Для реакции преципитации необходимо оптимальное соотношение концентраций антигена и антител. В избытке антигена преципитат частично или полностью растворяется; в результате бывает невозможно оценить реакцию или же эта оценка может быть ошибочной. В то время как преципитаты, образованные кроличьими антителами, растворяются только при избытке антигена, преципитаты, образованные антителами лошади, часто могут растворяться в избытке как антигена, так и антител.

Для реакции преципитации оптимальными являются те значения *температуры, рН и ионной силы среды*, которые существуют в организме. Ход реакции преципитации зависит от ионной силы раствора: с увеличением концентрации соли выше 0,15 М постепенно замедляется образование преципитата. В то же время рН среды в довольно широком диапазоне, от 6,5 до 8,6, не влияет на реакцию преципитации.

Реакция преципитации происходит вскоре после смешивания растворов антигена и иммунной сыворотки. Ее предварительный результат, как правило, можно учитывать через 30—60 мин инкубации полученной смеси при 37° С. Преципитация обычно завершается через 24 ч инкубации в холодильнике. При постановке реакции иммунодиффузии, когда соединение реагентов происходит лишь после их диффундирования в поддерживающей среде (например, в агаре), время образования преципитата, помимо прочих моментов, зависит от скорости диффузии.

Иммунохимические методы, основанные на реакции преципитации, очень удобны для качественного и количественного анализа белков, для определения гомогенности белковых препаратов и наличия в них примесей, а также для идентификации компонентов белковых смесей. Как вспомогательный метод реакция преципитации применяется для изучения структуры белка. Преимущество этого метода по сравнению с другими состоит в том, что он может быть использован тогда, когда нельзя провести количественный химический анализ, например при определении данного компонента в смеси белков. Именно в этих случаях результаты, полученные с помощью иммунохимических реакций, могут быть очень полезны.

МЕТОДЫ ИММУНОДИФфуЗИИ

Наиболее простой способ исследования растворимых антигенов в реакции преципитации заключается в том, что исследуемый раствор смешивают со специфической иммунной сывороткой, а затем наблюдают образование преципитата. Эта реакция применяется главным образом для определения титров. Только в том случае, когда реакция ставится с иммунной сывороткой, специфичной к данному белку, величина титра может служить характеристикой белкового препарата. Действительно широкое применение иммунохимического подхода к анализу белков началось только после того, как появились *иммунодиффузионные методы* исследования.

В 1905 г. Бекхольд, наложив козью сыворотку на смешанную с желатиной кроличью антисыворотку к белкам козы, наблюдал в геле образование двух полос преципитации. Иммунологическая природа этого «коллоидно-химического» явления была раскрыта лишь спустя несколько десятилетий. На основе реакции преципитации в геле был разработан ряд новых методов исследования, которые не только позволили охарактеризовать иммунологические свойства белков, но и открыли новые перспективы их углубленного анализа.

В сущности все методы иммунодиффузии основаны на явлении, которое наблюдал Бекхольд: взаимодействии антиген — антитело в геле. Растворимый белковый антиген и иммунная сыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу. В месте встречи обоих реагентов возникает полоса преципитации, которую можно легко наблюдать и регистрировать.

Для приготовления полужидкого геля используют ряд веществ. Их наиболее важным свойством должна быть инертность по отношению к исследуемым белкам и иммунной сыворотке. Эти вещества не должны вступать с ними в какие-либо реакции. К таким веществам можно отнести агар, крахмал, желатину, пектин и т. д. В настоящее время наиболее широко применяется агар, который оказался наилучшей средой при повседневной постановке реакций иммунодиффузии. При нагревании агар легко растворяется в воде и растворах солей и образует плотный гель при комнатной температуре. Прозрачность агара позволяет ясно различать возникающие в геле линии преципитации и окрашивать их соответствующими красителями.

Особое значение методов иммунодиффузии в изучении белков состоит в том, что с их помощью можно характеризовать белки на основании свойств, отличных от тех, которые были известны ранее. Электрофорез позволяет фракционировать белки в соответствии с их физико-химическими свойствами, в то время как с помощью классических методов иммунологии можно проводить дальнейшую дифференцировку белковых компонентов по антигенным свойствам.

Поэтому методы иммунодиффузии открывают перед исследователем дополнительные возможности:

1. Они позволяют одновременно анализировать несколько систем антиген—антитело (в смеси белков).

2. Можно сравнивать между собой разные белковые антигены.

3. Одновременно можно изучать и иммунологические и электрофоретические свойства белков.

4. Можно проводить количественное определение белков.

Каждый компонент белковой смеси и соответствующие антитела иммунной сыворотки в геле диффундируют навстречу друг другу, и каждая пара реагентов при слиянии образует одну линию преципитации. Число появившихся линий преципитации соответствует минимальному числу разных антигенов и соответствующих антител, присутствующих в системе. Методы иммунодиффузии очень чувствительны: они позволяют выявлять до 2—18 мкг белкового азота в 1 мл [3], с их помощью можно проводить изучение растворов с низкой концентрацией белка, которые не годятся для исследования методом электрофореза.

Электрофорез и классические иммунологические реакции также используются для сравнения белковых смесей и отдельных нативных белков. Однако разрешающая способность этих методов ограничена, так как они дают либо физико-химическую, либо иммунохимическую характеристику. В сравнении с ними метод иммунодиффузии более информативен, так как с его помощью в двух или нескольких сравниваемых белковых смесях можно обнаружить не только идентичные компоненты, но и возможные общие антигенные структуры, присутствующие в разных компонентах [11—13].

Особое значение приобрела комбинация иммунодиффузии с электрофорезом, названная методом *иммуноэлектрофореза* [4]. С его помощью можно одновременно электрофоретически разделить компоненты белковой смеси и получить их иммунологическую характеристику. Простота осуществления, высокая разрешающая способность и, наконец, очень малое количество материала, требуемое для анализа, ставят иммуноэлектрофорез в ряд наиболее ценных методов аналитического изучения белков. Соединение иммуноэлектрофореза с двойной диффузией в геле позволяет выявлять идентичность определенных компонентов двух белковых смесей [10].

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ИММУНОДИФфуЗИИ

Анализ белков сыворотки осуществляется разнообразными иммунохимическими методами, но здесь мы коснемся лишь двух методов: *двойной иммунодиффузии* и *иммуноэлектрофореза*. Оба метода нашли широкое и многостороннее применение. Их используют для исследования нефракционированной сыворотки и для анализа отдельных белковых фракций. С появлением этих методов уда-

лось открыть и охарактеризовать ряд новых белков сыворотки.

В агаровом геле или на ацетат-целлюлозной мембране белковый антиген и специфические антитела диффундируют навстречу друг другу и образуют в месте контакта линии преципитации, которые можно видеть невооруженным глазом или выявить специальным окрашиванием. При анализе двух белковых смесей, например двух разных сывороток или выделенных нативных белков, с помощью этого метода можно не только узнать число индивидуальных белков, присутствующих в нашей системе, но и получить данные об их иммунохимической идентичности, родственности или различиях. Все эти выводы могут быть сделаны на основании числа и взаимного расположения линий преципитации.

Иммуноэлектрофорез сыграл существенную роль в развитии исследований сывороточных белков. В свое время свободный и зональный электрофорезы позволили проанализировать сравнительно небольшое число индивидуальных белков сыворотки. За исключением 5 классических белков, выявляемых в свободном и зональном электрофорезе, остальные фракции сыворотки не всегда легко поддаются идентификации. Поэтому специальные виды зонального электрофореза с более высокой разрешающей способностью, чем простой электрофорез на бумаге, так и не вошли в повседневную практику клинических лабораторий, сохранив свое значение главным образом для научных исследований. Определение процентного содержания альбумина, α -, β - и γ -глобулинов нередко помогает поставить верный клинический диагноз, но мы должны помнить о том, что фракции белков, гомогенные в зональном электрофорезе, могут включать разные белки, образующие одну фракцию только благодаря сходной электрофоретической подвижности. Об этом свидетельствует также окрашивание липо- и гликопротеидов.

Согласно современным представлениям, плазма циркулирующей крови содержит свыше ста белков, включая гормоны и ферменты. Возможности электрофоретических методов разделения довольно ограничены; с их помощью удается получить лишь около 20 белковых фракций. Однако иммунохимические методы, особенно иммуноэлектрофорез, обладают большими возможностями: они позволяют идентифицировать до 30 фракций белков сыворотки. Значение иммуноэлектрофореза становится еще более наглядным, если принять во внимание, что с помощью микрометода Шейдигера [16] можно анализировать белок в чрезвычайно малых количествах — до 5—10 мкг.

Если по окончании электрофоретического разделения белков в агаровом геле навстречу им диффундирует специфическая иммунная сыворотка, то в местах встречи антигена и антител образуются дугообразные полосы преципитации, каждая из которых соответ-

ствует какому-нибудь одному типу сывороточного белка. Полосы преципитации вполне различимы в нативном препарате, но для лучшего выявления их можно окрасить.

Число линий преципитации на электрофореграмме зависит от используемой иммунной сыворотки. Например, хорошо себя зарекомендовавшая кроличья антисыворотка к белкам сыворотки человека фирмы Behringwerke (ФРГ) и аналогичная лошадиная антисыворотка института Нитан (Венгерская Народная Республика) позволяют идентифицировать примерно 20 белковых фракций сыворотки. Принципиальная возможность приготовления антисыворотки практически к любому белку значительно увеличивает применимость иммуноэлектрофореза. Кроме того, приготовив антисыворотки, специфичные к какому-либо одному-единственному белку (или небольшому числу белков), можно в смеси белков исследовать составляющие ее отдельные компоненты. Иммунные сыворотки, предназначенные для иммунохимического анализа отдельных белков плазмы человека, уже имеются в продаже.

В их числе можно найти антисыворотки к фракциям альбумина, α -1-, α -2-липопротеидов, α -2-макроглобулин-трансферрина, IgG, IgM, IgA и т. д. Очевидно, располагая соответствующими фракциями нативных белков и владея методами получения антисывороток, можно, учитывая запросы экспериментальных исследований, значительно расширить ассортимент имеющихся в продаже препаратов.

4. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ

Ионообменные смолы имеют ограниченное применение в хроматографическом анализе белков. При взаимодействии со смолами высокомолекулярные лабильные белки легко подвергаются денатурации и необратимо связываются с ними. Более того, емкость смол по отношению к белкам сравнительно низка, а чистота разделенных фракций не вполне удовлетворительна. Поэтому ионообменные смолы используются в белковой химии в основном для очистки глобулярных белков, имеющих относительно низкий молекулярный вес.

В последние годы вместо ионообменных смол при работе с белками применяют производные углеводов, в которые соответствующими методами введены ионизированные группы. К таким производным углеводов относятся *ионообменные целлюлозы и ионообменные полимеры декстрана* (сефадекс). По сравнению с ионообменными смолами эти ионообменники имеют определенные преимущества. Их гидрофильный матрикс очень хорошо связывает воду; в результате они весьма интенсивно набухают в водной среде, что обеспечивает лучшие условия проницаемости для крупных белковых молекул по сравнению со смолами, имеющими гидрофобные

сшивки. Новые ионообменники обладают более высокой емкостью по отношению к белкам и не вызывают их денатурации. Сорбируемые на этих ионообменниках белки обычно элюируются в условиях, при которых они стабильны.

В табл. 1 приведены важнейшие свойства наиболее распространенных ионообменников.

Таблица 1

Наиболее употребительные ионообменные целлюлозы

Тип	Название	Сокращенное обозначение	pK	pH элюирования	Функциональные группы, участвующие в ионном обмене		Буфер
					белок	ионообменник	
Анионит	Диэтил-амнио-этилцеллюлоза	ДЭАЭ-целлюлоза	8,0	8,0—5,0	—COOH	$\text{—N}^+\text{—H(CH}_2\text{—CH}_3)_2$	Фосфатный
Катионит	Фосфоцеллюлоза	Ф-целлюлоза	6,7	4,0—7,0	—NH ₂	—PO ₃ ²⁻	»
Катионит	Карбоксиметилцеллюлоза	КМ-целлюлоза	4,0	4,5—8,0	—NH ₂	$\text{—C}\begin{matrix} \text{O} \\ \text{O}^- \end{matrix}$	Ацетатный

У большей части белков в процессе хроматографии сразу происходит изменение величины R_f от 0 до 1. Это вызвано тем, что белки либо прочно сорбируются на ионообменнике, либо выходят с элюирующим буферным раствором, поскольку происходит одновременная взаимная нейтрализация многочисленных реакций взаимодействия между белком и ионообменником при данных pH и ионной силе раствора. Поэтому важно тщательно подбирать буферный раствор для ионообменной хроматографии белка. Ионообменную колонку обычно загружают при низкой ионной силе раствора. Для катионообменника оптимальная величина pH равна 4—5, для анионообменника 7—8. Элюирование с колонки катионообменника происходит при увеличении pH буферного раствора, а с колонки анионообменника — при уменьшении pH. В том и другом случае с изменением pH можно увеличивать ионную силу. Изменение pH и ионной силы элюирующего буферного раствора можно производить поэтапно (ступенчатое элюирование) или непрерывно (градиентное элюирование).

Следует отметить, что градиентное элюирование имеет определенные преимущества по сравнению со ступенчатым. При нем изменение среды происходит постепенно без резких скачков, которые во время ступенчатого элюирования могут стать причиной артефактов. Например, если слишком рано ввести новый буферный раствор, медленно мигрирующая часть белков из предыдущей ступени элюирования выйдет из колонки, имитируя новый пик.

Устройство приборов для хроматографии и осуществление самого эксперимента сравнительно просты. Выбрав подходящую систему ионного обмена и проведя рекомендованную обработку (регенерацию) ионообменника, при идентичных условиях элюирования (скорость потока, температура и т. д.) можно получать хорошо воспроизводимые хроматограммы. Благодаря этому фракционирование белков с помощью ионообменной хроматографии имеет широкое распространение.

Как и в предыдущих разделах, мы попытаемся кратко рассмотреть применение ионообменной хроматографии на примере изучения белков сыворотки. До сих пор наиболее популярным методом разделения сывороточных белков является хроматография на колонке анионообменной ДЭАЭ-целлюлозы по методу Собера и Петерсона [18]. Предложено несколько модификаций этого метода. Фракции сыворотки элюируются с колонки различными способами градиентного элюирования и выходят обычно в следующем порядке: IgG (как правило, имеет несколько пиков), β -, α -глобулины и затем альбумин. Этот метод особенно эффективен для приготовления препаратов IgG высокой иммунохимической чистоты из нативной сыворотки. Его можно комбинировать с другими способами очистки, например с осаждением риванолом, Na_2SO_4 и т. п. Подобным образом в качестве одного из этапов препаративного выделения анионообменная хроматография может применяться для очистки других белков сыворотки. При изучении структуры белка ее можно использовать для выделения и очистки полипептидов после расщепления белка ферментами или какими-либо другими веществами.

Для решения тех же задач и в тех же областях исследования можно применять катионообменную хроматографию, в которой чаще всего используют фосфоцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксиметил-сефадекс.

5. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

Разработанная Поратом и Флодиным в 1959 г. [15] гель-фильтрация явилась большим достижением в развитии фракционирования белков по молекулярному весу. Материал, используемый в этом методе в качестве неподвижной фазы, носит фирменное название

сефадекс и представляет собой нерастворимый в воде высокогидрофильный декстран с поперечными сшивками, имеющий пористую структуру. Благодаря многочисленным гидрофильным группам он способен разбухать в воде и водных растворах солей, образуя гель, который может выполнять роль молекулярного сита при разделении веществ разного молекулярного веса. Размер пор этого сита определяется частотой поперечных сшивок в декстране. Чем ближе друг к другу расположены поперечные сшивки, тем плотнее пространственный каркас геля и соответственно меньше способность сефадекса связывать воду.

Если раствор, содержащий вещества различного молекулярного веса, пропустить через колонку, заполненную гелем сефадекса, то более мелкие молекулы проникнут во внутреннюю часть гелеобразующих гранул и в результате их миграция через колонку будет замедлена. В то же время вещества большего молекулярного веса не проникают внутрь гранул геля и мигрируют быстрее мелких молекул. Разные скорости миграции приводят к разделению веществ при их прохождении через «молекулярные сита».

Фирма Pharmacia (Швеция) выпускает 18 типов сефадексов (без ионообменных свойств), которые отличаются друг от друга частотой поперечных сшивок. Важнейшие свойства сефадексов приведены в табл. 2. Символ, указывающий тип сефадекса (G-25, G-50 и т. д.), обозначает пористую структуру (G) и величину поглощения воды на грамм сухого веса сефадекса, т. е. указывает частоту поперечных сшивок декстрана. У сефадексов с высоким значением индекса цифра указывает нижний предел молекулярного веса веществ (в тысячах), не проникающих внутрь гранул геля. Например, вещества с молекулярным весом меньше 100 000 могут проникать внутрь гранул сефадекса G-100, тогда как вещества с более крупными молекулами выходят в свободном объеме раствора.

Благодаря перечисленным выше свойствам сефадексы интенсивно используются при изучении структуры белков. Чаще всего их применяют для разделения белков в зависимости от молекулярного веса, для очистки белковых фракций, для концентрирования разбавленных растворов белка и для обессоливания белковых препаратов.

Гель-фильтрация все шире используется для фракционирования белков сыворотки. Наиболее подходящим в данном случае является сефадекс G-200. С колонки этого геля белки сыворотки элюируются тремя пиками. Первый пик соответствует в основном липопротеидам и макроглобулинам, вторым пиком выходит IgG, в третьем пике содержатся главным образом альбумин и трансферрин. В принципе гель-фильтрацию на G-200 можно использовать и для выделения иммуноглобулинов.

С 1962 г. в хроматографии стали применять полиакриламидные

Таблица 2

Типы сефадексов

Тип	Размер частиц, мкм	Поглощение воды, мл/г сухого геля	Объем набухшего геля, мл/г сухого геля	Область разделения по молекулярному весу
G-10	40—120	$1,0 \pm 0,1$	2—3	—700
G-15	40—120	$1,5 \pm 0,2$	2,5—3,5	—1 500
G-25 крупнозернистый	100—300	$2,5 \pm 0,2$	4—6	1000—5 000
G-25 среднезернистый	50—150	$2,5 \pm 0,2$	4—6	1000—5 000
G-25 мелкозернистый	20—80	$2,5 \pm 0,2$	4—6	1000—5 000
G-25 сверхмелкий	10—40	$2,5 \pm 0,2$	4—6	1000—5 000
G-50 крупнозернистый	100—300	$5,0 \pm 0,3$	9—11	1500—30 000
G-50 среднезернистый	50—150	$5,0 \pm 0,3$	9—11	1500—30 000
G-50 мелкозернистый	20—80	$5,0 \pm 0,3$	9—11	1500—30 000
G-50 сверхмелкий	10—40	$5,0 \pm 0,3$	9—11	1500—30 000
G-75	40—120	$7,5 \pm 0,5$	12—15	3000—70 000
G-75 сверхмелкий	10—40	$7,5 \pm 0,5$	12—15	3000—70 000
G-100	40—120	$10,0 \pm 1,0$	15—20	4000—150 000
G-100 сверхмелкий	10—40	$10,0 \pm 1,0$	15—20	4000—150 000
G-150	40—120	$15,0 \pm 1,5$	20—30	5000—400 000
G-150 сверхмелкий	10—40	$15,0 \pm 1,5$	20—30	5000—400 000
G-200	40—120	$20,0 \pm 2,0$	30—40	5000—800 000
G-200 сверхмелкий	10—40	$20,0 \pm 2,0$	30—40	5000—800 000

гели [5,8]. Фирма Bio-Rad Laboratories выпускает более 30 гелей для хроматографии под коммерческим названием биогели (табл. 3). Сухие биогели, подобно сефадексам, набухают в воде и имеют такие же свойства в диапазоне pH от 2 до 11. Первое сообщение о гель-хроматографии в агаре в 1961 г. сделал Полсон [14]. Главной особенностью гелей агара и агарозы является пригодность для фракционирования веществ с большим молекулярным весом, которые не удастся разделить на сефадексе G-200 или биогеле P-300.

Агар и агароза при нагревании становятся жидкими. В связи с этим их гели при температуре выше 50°C теряют стабильность. Их нельзя использовать при pH ниже 4,5 и выше 9,0; поэтому при работе с этими гелями крайне важно соблюдать указания изготовителя относительно температуры и величины pH. В продаже имеются следующие гели агарозы: сагавак (фирма Seravac Laboratories), сефароза (фирма Pharmacia Fine Chemicals), гелароза (фирма Litex) и биогель А (фирма Bio-Rad Laboratories).

Таблица 3

Типы биогелей

Тип биогеля	Размер частиц, мкм	Предел использования по мол. весу	Область раз- деления по мол. весу	Объем набух- шего геля, мл/г	Поглощение воды, г/г сухого биогеля	Скорость про- текания, мл/час/см ²
Биогель Р-2	50—100	2 600	200—2 600	3,8	1,5	250
» Р-2	100—200	2 600	200—2 600	3,8	1,5	150
» Р-2	200—400	2 600	200—2 600	3,8	1,5	40
» Р-2	—400	2 600	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-4	50—100	3 600	500—4 000	5,8	2,4	225
» Р-4	100—200	3 600	500—4 000	5,8	2,4	125
» Р-4	200—400	3 600	500—4 000	5,8	2,4	40
» Р-4	—400	3 600	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-6	50—100	4 600	1 000—5 000	8,8	3,7	200
» Р-6	100—200	4 600	1 000—5 000	8,8	3,7	110
» Р-6	200—400	4 600	1 000—5 000	8,8	3,7	40
» Р-6	—400	4 600	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-10	50—100	12 000	5 000—17 000	12,4	4,5	200
» Р-10	100—200	12 000	5 000—17 000	12,4	4,5	100
» Р-10	200—400	12 000	5 000—17 000	12,4	5,5	35
» Р-10	—400	12 000	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-30	50—100	30 000	20 000—50 000	14,8	5,7	150
» Р-30	100—200	30 000	20 000—50 000	14,8	5,7	90
» Р-30	—400	30 000	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-60	50—100	60 000	30 000—70 000	19,0	7,2	125
» Р-60	100—200	60 000	30 000—70 000	19,0	7,2	40
» Р-60	—400	60 000	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-100	50—100	100 000	40 000—100 000	19,0	7,5	90
» Р-100	100—200	100 000	40 000—100 000	19,0	7,5	40
» Р-100	—400	100 000	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-150	50—100	150 000	50 000—150 000	24,0	9,2	60
» Р-150	100—200	150 000	50 000—150 000	24,0	9,2	35
» Р-150	—400	150 000	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-200	50—100	200 000	80 000—300 000	34,0	14,7	30
» Р-200	100—200	200 000	80 000—300 000	34,0	14,7	15
» Р-200	—400	200 000	Для тонкослойной хроматографии			
» Р-300	50—100	300 000	100 000—400 000	40,0	18,0	20
» Р-300	100—200	300 000	100 000—400 000	40,0	18,0	8
» Р-300	—400	300 000	Для тонкослойной хроматографии			

6. МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ¹

Мембранная фильтрация, или как ее еще называют — ультра-фильтрация или молекулярная фильтрация, представляет собой процесс разделения веществ с помощью мембран, имеющих определенную величину пор. За последние годы мембранная фильтрация получила широкое распространение в связи с производством большого набора разных типов мембран и специального оборудования. Мембранная фильтрация используется как быстрый и мягкий способ удаления растворителя из раствора макромолекул или же замены одного растворителя другим. Чаще всего с задачами такого рода сталкиваются при обессоливании раствора макромолекул или же при его концентрировании. Другой важной задачей, которую можно решить с помощью мембранной фильтрации, является разделение двух или большего числа компонентов, отличающихся размерами своих молекул. Наконец, молекулярная фильтрация позволяет изучать связывание макромолекулами низкомолекулярных соединений.

В обзоре Блатта перечислены следующие основные требования, которые предъявляются к мембранам: они должны обладать определенными размерами пор, пропускать раствор с достаточно высокой скоростью и иметь минимальную адсорбирующую способность. В настоящее время ряд фирм выпускает мембраны для фильтрации, в большей или меньшей степени удовлетворяющие этим требованиям (табл. 4). Наибольшее распространение получили анизотропные мембраны, состоящие из плотной, очень тонкой пленки-мембраны с избирательной проницаемостью, которая прикреплена к пористой подложке. В табл. 4 указана величина молекулярного веса веществ, задерживаемых мембраной, но в действительности мембраны задерживают не 100% соответствующих макромолекул, а несколько меньше. Отсюда следует, что для более полной задержки следует брать мембрану с меньшими, чем указано в таблице, величинами пор. Например, для альбумина (молекулярный вес 67 000) лучше использовать РМ-30, чем ХМ-50. Следует также помнить, что способность проходить через мембрану зависит не только от молекулярного веса, но и от формы молекулы и ее гибкости. Кроме приведенных в табл. 4, следует упомянуть и о выпускаемых фирмой Sartorius (ФРГ) изотропных ультрафильтрах, изготовленных из регенерированной целлюлозы (серия SM 115, величина пор у разных фильтров серии 150—5 нм), ацетата целлюлозы (серия SM 117, величина пор 35—5 нм) и нитрата целлюлозы (серия SM 121, величина пор 15—5 нм).

¹ Данный раздел написан Р. С. Незлиным и включен в главу по согласованию с авторами. — *Прим. ред.*

Таблица 4

Мембраны для ультрафилтрации (Blatt, 1971)

Обозначение	Изготовитель	Тип мембраны	Скорость тока воды при 6,6 атм, мл/см ² /мин	80-100%-ная задержка вещества с мол. весом
Гель-целлофан	du Pont, Union Carbide	Гомогенно-целлюлозная	0,004	10 000 (цитохром с)
РЕМ-мембрана	Gelman	Изотропно-целлюлозная	0,02	40 000 (овальбумин)
«Р-мембрана»	Schleicher-Schüll	Гомогенно-целлюлозная	0,08	60 000 (альбумин)
СА-тип В	General Atomics	{ Анизотропная, ацетат-	0,007	600 (рафиноза)
СА-тип С	»	{ целлюлозная	0,003	350 (сахароза)
Диафло UM-05	Amicon Corp.	{ Анизотропная, полиэлект-	0,05	350 (сахароза)
Диафло UM-2	»	{ ролитный	0,1	600 (рафиноза)
Диафло UM-10	»	{ комплекс	0,3	10 000 (декстран 10)
Диафло РМ-10	»	{ Анизотропная, аромати-	0,5	10 000 (цитохром с)
Диафло РМ-30	»	{ ческий полимер	0,7	30 000 (овальбумин)
Диафло ХМ-50	»	{ Анизотропная, замещен-	0,7	50 000 (альбумин)
Диафло ХМ-100А	»	{ ный олефин	0,9	100 000 (7S-глобулин)
Диафло ХМ-300	»		1,1	300 000 (апоферритин)
HFA-100	Abcor, Inc.	{ Анизотропная	0,07	10 000 (декстран 10)
HFA-200	»	{ целлюлозная	0,4	20 000 (декстран 20)
HFA-300	»		1,4	70 000 (альбумин)
PSAC	Millipore Corp.		1,2	1000 (бромкрезоловый зеленый)
PSED	»		0,75	25 000 (α -химотрипсин)
PSDM	»		1,0	40 000 (овальбумин)

Одной из важных проблем мембранной фильтрации является возникновение градиента концентрации: у самой поверхности мембраны концентрация макромолекул становится столь высока, что может препятствовать ультрафильтрации. Особенно это заметно при работе с высокомолекулярными белками. Для получения хороших результатов при мембранной фильтрации очень существенную роль играет выбор оборудования.

Весьма просты в работе имеющиеся в продаже сосудики для фильтрации под давлением с постоянным перемешиванием жидкости вблизи мембраны (*stirred cells*). Получили широкое распространение удобные и надежные в работе такого рода ячейки, выпускаемые фирмой Amicon (США) нескольких размеров — на 10, 60, 200, 400 и 2000 мл. Сделаны они из материалов, обладающих малой адсорбирующей способностью, легко собираются и при аккуратном пользовании весьма долговечны. Мембраны фирмы Amicon, обладающие большой избирательностью, можно использовать многократно, если же ток жидкости через них постепенно замедляется, обработка разбавленными растворами протеаз (например, трипсина) вновь восстанавливает их фильтрующую способность. Давление газа (например, азота), равное 2—3 атм, как правило, обеспечивает достаточно быстрое вытекание жидкости. Сосудики можно поставить в ледяную баню; на холоду, однако, фильтрация идет в 2 раза медленнее.

Недостаток сосудиков с перемешиванием заключается в том, что с ними довольно трудно работать тогда, когда мы имеем дело с концентрированными белковыми растворами. Другие, более сложные системы оказываются пригодными и в этих случаях, причем они обладают большей скоростью фильтрации. К ним относятся приборы с системой тонких канальцев над мембраной (*thin-channel system*) и приборы с системой полых волокон (микротубулярных мембран) с диаметром отверстий 0,2—0,5 мм (*hollow-fiber system*). Высокая скорость тока жидкости в канальцах предотвращает возникновение градиента концентрации у стенок. При увеличении площади фильтрации скорость вытекания резко возрастает, но одновременно увеличивается неспецифическая сорбция белков, и в связи с этим при работе с разведенными растворами наблюдаются большие потери. В продаже имеются микротубулярные мембраны фирмы Amicon (США), задерживающие белки с молекулярным весом 10 000 (РМ) и 50 000 (ХМ) и мембраны фирмы Bio-Rad (США), задерживающие белки с молекулярным весом 100 000 (Био-Файбер 80), 30 000 (Био-Файбер 50) и 5000 (Био-Файбер 20).

В последнее время начали выпускаться также очень простые системы для однократного концентрирования небольших по объему образцов, так называемые сосудики Миникон (Amicon, США). Это плоские конусовидные сосудики с одной стороной-мембраной, к которой с внешней стороны прилегает слой, адсорбирующий жид-

кость. Нижняя остроконечная часть сосуда лишена мембраны, здесь накапливается сконцентрированная жидкость. Для такого типа сосудов не требуется никакого дополнительного оборудования (мешалки, баллона с газом) и поэтому они особенно удобны в клинических лабораториях для быстрого концентрирования образцов мочи, спинномозговой жидкости или других белковых растворов с целью их последующего исследования электрофоретическим или иным методом. В продаже имеются следующие типы сосудов Миникон, перечисленные в табл. 5.

Таблица 5

Тип	Способность к кон- центрированию, раз	Задерживаются белки с мол. весом
B-15	100	15 000
A-25	20	25 000
S125	4	125 000
A-75	20	75 000

Цитированная литература

1. Aronsson T., Grönwall A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., **9**, 338 (1957).
2. Davis B. J., Ann. N. Y. Acad. Sci. U. S., **121**, 404 (1964).
3. Finger I., Kabat E. A., J. Exp. Med., **108**, 453 (1958).
4. Grabar P., Williams C. A., Biochim. Biophys. Acta., **17**, 67 (1955).
5. Hjerten S., Mosbach Z., Anal. Biochem., **3**, 109 (1962).
6. Kohn J., Protides of Biol. Fluids, Elsevier Publ. Co, Amsterdam, p. 120, 1958.
7. Kohn J., Nature, **183**, 1512 (1959).
8. Lea D. J., Shon A. H., J. Chromatogr., **40**, 159 (1962).
9. Ornstein L., Ann. N. Y., Acad. Sci. U. S., **121**, 321 (1964).
10. Osserman E. P., J. Immunol., **84**, 93 (1960).
11. Ouchterlony O., Acta Path. Microbiol. Scand., **25**, 186 (1948).
12. Ouchterlony O., Acta Path. Microbiol. Scand., **26**, 50 (1949).
13. Ouchterlony O., Acta Path. Microbiol. Scand., **32**, 231 (1953).
14. Polson A., Biochim. Biophys. Acta, **50**, 565 (1961).
15. Porath J., Flodin P., Nature, **183**, 1657 (1959).
16. Scheidegger J. J., Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
17. Scheurlen P. G., Z. Naturforsch., **17b**, 598 (1962).
18. Sober H. A., Peterson E. A., J. Am. Chem. Soc., **78**, 751 (1956).

Рекомендуемая литература

- Blatt W. F., Methods in Enzymol., vol. XXII, Academic Press, New York, London, p. 39 (1971).
- Clausen J., Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules, North Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1969.

- Fischer L.*, Introduction to Gel Chromatography, North Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1969.
- Freedman S. O.*, Clinical Immunology, Harper-Row, New York, 1971.
- Gordon A. H.*, Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels, North Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1969.
- Kabat E. A.* Einführung in die Immunochemie, Springer Verlag, 1971.
- Leach S. J.* ed., Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Academic Press, New York, London, 1969.
- Maurer H. R.*, Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Walter de Gruyter Berlin, New York, 1971.
- Mollison P. L.*, Blood Transfusion in Clinical Medicine, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1972.
- Schultze H. E.*, *Heremans J. E.*, Molecular Biology of Human Proteins, Vol. I, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1966.
- Weir D. M.*, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1973.
- Williams C. A.*, *Chase M. W.*, Methods in Immunology and Immunochemistry, vols. II—III, Academic Press, New York, London, 1968, 1971.

Б. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ БЕЛКОВ

Для расшифровки аминокислотной последовательности белков и полипептидов, как и для любого другого структурного анализа, к объектам исследования предъявляется ряд требований. Подлежащий анализу материал должен быть однородным, а его основные физические параметры и прежде всего молекулярный вес и точный аминокислотный состав должны быть известны. Выполнение этих условий, однако, зачастую ставит перед исследователями довольно трудные задачи.

Проблема гомогенности белков в свое время решалась относительно просто с помощью традиционных методов анализа. Препарат считали гомогенным, если он не делился на фракции при электрофорезе или при ультрацентрифугировании. В настоящее время эти критерии гомогенности утратили свое значение. В нашем распоряжении появились более чувствительные методы исследования и стали обязательными более строгие показатели гомогенности. Ионнообменная хроматография и электрофорез в геле являются сейчас наиболее чувствительными методами выявления так называемой микрогетерогенности белковых препаратов, какова бы ни была ее природа. Термин «микрогетерогенность» предложили Синг [82] в 1943 г. и Колвин с сотр. [6] в 1954 г. Из методов электрофореза в геле наиболее чувствительным для анализа микрогетерогенности белков оказался вертикальный диск-электрофорез. При использовании этого метода требуются весьма малые количества необходимого для исследования материала, с его помощью можно одновременно анализировать большое число образцов и к тому же он отличается высокой разрешающей способностью. Диск-электрофорезом можно обнаружить микрогетерогенность препарата даже в том случае,

если компоненты имеют идентичную аминокислотную последовательность, но различаются по конформации молекул. Этот метод позволяет выявлять также самые незначительные химические различия.

Высокая разрешающая способность хроматографии с использованием ионообменных целлюлоз, декстрана и других материалов делает этот метод наиболее подходящим для выделения гомогенных белковых препаратов.

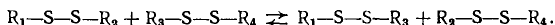
В последнее время появилась возможность определять аминокислотный состав белков с помощью автоматических аминокислотных анализаторов. Когда в 1948 г. Мур и Стейн [55] в дополнение к классическим методам органической химии, а также манометрическому и бактериологическому анализу ввели ионообменную хроматографию, наступил поворотный момент в развитии химии аминокислот. В основу работы созданных сотрудниками Рокфеллеровского института современных автоматических аминокислотных анализаторов была положена ионообменная хроматография. Принцип работы этих приборов заключается в следующем. Исследуемый белок гидролизуют, затем гидролизат подвергают хроматографии на смоле типа дауэкс 50×8 в Na-форме. Элюирование производят с помощью непрерывной подачи буферного раствора. Выходящий из колонки элюат попадает в пластмассовую ячейку особой формы, где он смешивается с раствором нингидрина. Подачу нингидрина осуществляет специальный насос, работающий синхронно с насосом, подающим буферный раствор на колонку. Затем смесь элюата с нингидрином проходит через тефлоновый капилляр, который погружен в кипящую баню. В этих условиях в растворах происходит нингидриновое окрашивание, интенсивность которого измеряется в проточной кювете спектрофотометрически. Поглощение света регистрируется самозаписью. Применение сферических смол [80] позволило сократить время исследования одного образца примерно в четыре раза, а использование особых ячеек сделало вполне допустимыми для анализа очень малые количества исследуемого вещества — порядка 0,01—0,05 мкмоль [38]. Введение одноколочной процедуры значительно упрощает метод [9, 29, 43, 60]. С помощью этой методики в одной и той же пробе можно определить кислые, нейтральные и основные аминокислоты, что не только экономит исследуемый материал, но и повышает точность и сокращает время исследования. Работая на стандартном аминокислотном анализаторе и пользуясь некоторыми модификациями известных методов, можно полностью закончить анализ одного вещества в течение 3 ч [9].

Определение аминокислотной последовательности осуществляется по принципу «собирания мозаики». Предположим, что мы имеем вещество с последовательностью А. В. С. Д. Е. F. G. H. I. J. K. L. M. N и можем воспользоваться двумя методами специфического расщепления пептидных связей. Один из методов разрывает связь

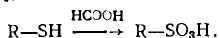
... F. G ..., а другой — связь ... H. I... Применим оба метода расщепления к нашей модели. Первый метод даст два пептида: A. B. C. D. E. F. и G. H. I. J. K. L. M. N. Вторым методом даст также два пептида: A. B. C. D. E. F. G. H. и I. J. K. L. M. N. Последовательность исходного пептида определяют на основании анализа четырех полученных фрагментов. Для этого нужно определить их аминокислотный состав, а также N- и C-концевые группы. Аминокислотную последовательность этих малых пептидов удастся определить путем поэтапного расщепления, дальнейшего частичного гидролиза и определения концевых групп получившихся более мелких фрагментов. При этом возникает возможность выявить «перекрывающиеся» последовательности пептидных фрагментов. Например, часть G. H... пептида, полученного первым методом расщепления, имеет такую же последовательность, как и C-концевая часть фрагмента ... F. G. H.— одного из пептидов, полученных вторым методом. По принципу «собирания мозаики» мы можем восстановить структуру исходного пептида на данном участке.

Очевидно, чем крупнее молекула анализируемого белка, тем сложнее проблема отыскания перекрывающихся последовательностей, причем одним из наиболее важных моментов в определении последовательности является специфический гидролиз.

Значительное затруднение при расшифровке последовательности аминокислот может возникнуть, если в молекуле анализируемого белка присутствуют остатки цистеина или цистина. При окислении цистеина образуются S—S-мостики, которые не только являются причиной ошибочных выводов, но и препятствуют дальнейшему анализу, так как содержащие их белки и полипептиды весьма устойчивы к ферментативному расщеплению. Поэтому до проведения анализа рекомендуется избавляться от S—S-мостиков и предотвращать спонтанное окисление свободных SH-групп. Кроме того, следует иметь в виду возможность SH/S—S-обмена. Если в реакционной смеси одновременно присутствуют свободные SH-группы и S—S-мостики, в ней могут происходить перестройки, при которых связанные S—S-мостиком пары пептидов обмениваются своими партнерами:



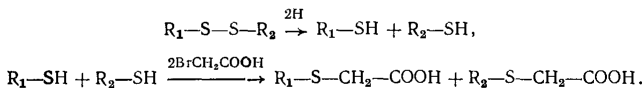
SH- и S—S-группы элиминируют с помощью количественной и необратимой реакции окисления белков надмуравьиной кислотой. В результате этой реакции цистеин или цистин превращается в цистеиновую кислоту [86].



При окислении надмуравьиной кислотой триптофан разрушается, а значительная часть тирозина при последующем гидролизе HCl превращается в хлорированный тирозин [85]. При низкой температуре окисление проходит более мягко, причем в этих условиях

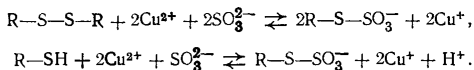
количественный характер образования цистеиновой кислоты сохраняется [35].

Разрыв S—S-связей можно вызвать также с помощью реакции восстановления. Если в качестве восстановителей используются тиосоединения, то в ходе реакции возникают свободные реакционноспособные SH-группы, которые могут стать помехой дальнейшему анализу. Поэтому после реакции восстановления их необходимо блокировать. Лучшим способом блокирования является карбоксиметилирование. Схема реакции такова:



В результате образуется производное карбоксиметилцистеина. Если в этой реакции использовать ^{14}C -Br- или ^{14}C -I-ацетат, то, помимо разрыва S—S-связей и блокирования возникающих SH-групп, можно радиоактивно пометить пептиды, содержащие цистеиновые остатки.

Одним из вариантов восстановления является реакция *сульфитолиза*. В присутствии Cu^{2+} при щелочном pH соединения, имеющие S—S-связи (или свободные SH-группы), под влиянием солей сернистой кислоты превращаются в S-сульфонаты. Реакция происходит следующим образом:



В структурном анализе белков реакция сульфитолиза никогда широко не использовалась, и в настоящее время ее почти не применяют [5, 11, 14, 33, 59].

Одна из основных стадий расшифровки аминокислотной последовательности состоит в частичном расщеплении молекул исследуемого белка. Используемые для этой цели методы *частичного гидролиза* или *специфического химического расщепления*, кроме максимально возможной специфичности, должны отвечать следующим требованиям: 1) в ходе реакции аминокислоты не должны разрушаться; 2) специфичность реакции, т. е. расщепление в строго определенном месте, должна быть заранее известна; 3) в ходе расщепления не должно возникать побочных реакций, таких, как перенос ацильной группы, транспептидирование или образование случайных пептидов.

Методы частичного гидролиза используются широко, но почти все они лишены специфичности и поэтому пригодны только для получения мелких фрагментов, например на конечных этапах расщепления больших пептидов. Самым старым из методов неспецифического частичного гидролиза является частичный кислотный гидролиз.

Сэнгер и Туппи [72] применили этот метод при расшифровке структуры В-цепи инсулина. Выделив и проанализировав не менее 60 пептидов, им удалось расшифровать только четыре участка цепи, включающих всего 19 остатков аминокислот. В частичных кислотных гидролизатах, помимо пептидов, встречается до 25% свободных аминокислот [54]. В ходе кислотного гидролиза полностью разрушается триптофан [53] и в значительной степени повреждаются оксиаминокислоты [65].

Из методов *неспецифического ферментативного расщепления* чаще всего применяется гидролиз пепсином, папаином, бактериальными или грибковыми протеазами. Все три типа ферментов дают гидролизаты, представляющие собой сложную смесь мелких пептидов. В связи с этим их лучше использовать на конечных этапах расщепления крупных пептидов, полученных методами специфического гидролиза. Общий обзор методов ферментативного гидролиза сделал Хилл [34]; подробные сводки о действии пепсина, папаина и бактериальных протеаз опубликовали Бовей и Янари [2], Смит и Киммель [78] и Хагихара [28] соответственно.

Специфический ферментативный гидролиз можно провести в присутствии трипсина и химотрипсина. Эти ферменты по современным представлениям обладают наибольшей специфичностью расщепления, а их препараты, имеющиеся в продаже, отличаются высокой чистотой.

Трипсин гидролизует пептидные связи, образуемые основными аминокислотами, т. е. связи, в которых участвуют остатки лизина и аргинина. Пептидные связи Лиз-Про и Арг-Про устойчивы к гидролизу. Частичной устойчивостью к трипсиновому гидролизу обладают также некоторые другие пептидные связи, например в структуре ... Лиз-Лиз-Х... связь Лиз-Лиз или связи в пептидах Арг-Арг, Арг-Лиз и Лиз-Арг. «Скопление» основных аминокислот в определенных участках пептида обуславливает частичную устойчивость его к гидролизу. То же самое справедливо и для пептидных связей Лиз-Глу и Арг-Глу.

Примесь химотрипсина в препарате трипсина может в значительной степени исказить специфичность трипсинового гидролиза, поэтому крайне важно избегать загрязнения трипсина химотрипсином. Загрязненный препарат трипсина можно очистить хроматографией [84]; химотрипсин, содержащийся в препарате, можно инактивировать кислотой или недавно полученными синтетическими ингибиторами.

Благодаря специфичности триптического гидролиза им можно «управлять», внося те или иные изменения в структуру гидролизуемых соединений. Например, по мере аминоэтилирования свободных SH-групп увеличивается число NH₂-групп и, следовательно,

увеличивается количество пептидных связей, чувствительных к трипсину, т. е. в гидролизате оказывается больше триптических пептидов [48, 63]. Если же, наоборот, обратимо или необратимо заблокировать NH_2 -группы лизина, то трипсин сможет гидролизовать только те пептидные связи, в которых участвует аргинин. В этом случае в гидролизате обнаруживаются крупные аргиниловые пептиды. При обратимом блокировании остатков лизина, например путем трифторацетилирования, после выделения аргиниловых пептидов их можно деблокировать, а затем подвергнуть триптическому гидролизу; при этом будут расщепляться только пептидные связи лизина.

Новейшим методом обратимого блокирования ϵ - NH_2 -групп можно считать реакции маленинирования [47] и цитраконилирования [13]. Оба реагента, участвующие в этих реакциях, не только блокируют аминокруппы, но и увеличивают растворимость крупных фрагментов, полученных при триптическом гидролизе. Благодаря обратимости обеих реакций ацилирующие реагенты подобного типа могут с успехом применяться для расшифровки первичной последовательности.

Изложенный выше метод «управляемого протеолиза» играет существенную роль в анализе аминокислотной последовательности высокомолекулярных белков.

Химотрипсин расщепляет больше пептидных связей, чем трипсин. При кратковременном гидролизе в течение 2—3 ч фермент расщепляет пептидные связи, в которых участвуют остатки тирозина, фенилаланина и лейцина. И в этом случае полную устойчивость к гидролизу сохраняют пептиды пролина. «Скопления» ароматических аминокислот, например структуры, подобные ... Фен-Фен ... или... Тир-Фен ... и т. д., обладают частичной устойчивостью к гидролизу. Однако с увеличением продолжительности гидролиза происходит разрушение пептидных связей многих типов. Подробный обзор по химотрипсину был сделан Деснуэллем [7]; сведения о специфичности химотриптического гидролиза можно найти в обзоре Хилла [34].

Специфическое химическое расщепление пептидных связей можно осуществить с помощью двух окисляющих агентов. Один из них, N-бромсукцинимид, вызывает расщепление пептидной связи, в которой участвует остаток триптофана, с одновременным разрушением этого остатка и его окислением [64]. Успешное использование этого метода удалось лишь в нескольких случаях. Помимо изучения структуры полипептида, выделенного из вируса табачной мозаики, N-бромсукцинимид был использован при анализе последовательности низкомолекулярного глюкагона [58] и N-концевой последовательности гемоглобина [79]. Существенный недостаток этого метода заключается в том, что N-бромсукцинимид расщепляет не все пептидные связи, образуемые остатками триптофана.

В реакциях с одним и тем же препаратом белка могут быть окислены от 2 до 80% этих связей. Более того, некоторые белки, например цитохром с, оказываются полностью устойчивыми к действию N-бромсукцинимидов.

Другой окислитель, бромциан, — более надежный реагент [26]. Он разрушает пептидные связи, в которых участвует остаток метионина. Механизм этой реакции подобен расщеплению иодацетамидом [45]. Окисление бромцианом широко применяют как специфичный метод для получения крупных пептидных фрагментов. Весьма успешно он был использован наряду с другими методами при расшифровке аминокислотной последовательности рибонуклеазы [27], миоглобина [17], трипсиногена [36] и альдолазы [42, 68, 69].

Даже при специфическом ферментативном или химическом расщеплении белка или полипептида среднего молекулярного веса получается довольно сложная смесь пептидов. Существует набор разнообразных методических приемов фракционирования этой смеси и очистки отдельных компонентов. Вряд ли можно предложить какую-то одну схему фракционирования, которая была бы равным образом применима ко всем белковым гидролизатам. Первым этапом обычно является *предварительное фракционирование* в соответствии с зарядом или размером пептидов. За ним следует уже окончательная очистка пептидов с помощью электрофореза, ионообменной или иной хроматографической процедуры.

Предварительное разделение смеси пептидов в соответствии с их электростатическим зарядом можно осуществить с помощью свободного ионофореза (или многокамерного электрофореза), который успешно применяли Сэнгер и Туппи [72]. Однако этот метод в настоящее время полностью вытеснен *гель-фильтрацией*, т. е. разделением в соответствии с размерами молекул. После появления первых работ в этом направлении [44, 83] чрезвычайно полезный метод гель-фильтрации был разработан Поратом и Флодиным [61]; позднее Флодин теоретически обосновал его [20].

При гель-фильтрации наиболее употребительны два типа гелей: гели, полученные путем ферментирования декстрана (сефадексы), и синтетические гели акриламида (биогели). Акриламидные гели обладают низкой адсорбционной способностью, поэтому при равной разрешающей способности для них характерен больший выход фракционируемого вещества, чем для гелей декстрана.

После предварительного фракционирования дальнейшую очистку смеси пептидов удобно производить с помощью *электрофореза на бумаге*. Существует четыре разновидности этого метода: 1) вертикальный электрофорез на бумаге без охлаждения [51]; 2) вертикальный электрофорез на бумаге с охлаждением толуолом [50]; 3) горизонтальный электрофорез на бумаге с охлаждением типа «сэндвич» [25]; 4) горизонтальный электрофорез на бумаге с охлаждением подложки [10].

С помощью горизонтального электрофореза на бумаге можно проводить анализ смеси пептидов методом «отпечатков пальцев» и выделять микроколичества различных фракций. Для решения этих задач удобен электрофорез на бумаге в двух буферных растворах, который позволяет в одноэтапном эксперименте четко разделить кислые и основные компоненты смеси [8]. После гидролиза средней продолжительности в реакционной смеси обычно присутствует смесь кислых и основных пептидов. Одновременная подача двух разных буферных растворов способствует более полному разделению таких пептидов.

Применение при электрофорезе летучих буферов позволяет сразу же после высушивания бумаги элюировать разделенные пептиды и проводить их дальнейшее фракционирование.

Из летучих буферов чаще всего используют системы пиридин — уксусная кислота и уксусная кислота — муравьиная кислота с величинами рН 6,5; 3,5 и 1,9.

В ходе очистки вслед за электрофорезом при разных значениях рН для разделения пептидов применяется *хроматография на бумаге*.

Общепринято определять пептиды с помощью нингидриновой реакции. Добавление Cd^{2+} к раствору нингидрина не только увеличивает ее чувствительность, но и повышает стабильность окрашивания. N-ацильные пептиды можно выявлять в реакции с хлором [67]. Некоторые аминокислоты выявляются реакциями специфического окрашивания, например гистидин — реакцией Паули, аргинин — реакцией Сакагуши. С помощью этих же реакций можно обнаруживать и пептиды, содержащие гистидин и аргинин.

Если электрофорез и хроматографию на бумаге можно отнести к микропрепаративным методам, то метод разделения смеси пептидов с помощью ионообменной хроматографии следует, пожалуй, считать макропрепаративным. Его главное преимущество заключается в том, что он позволяет обрабатывать большие количества материала и получать несомненно большие выходы фракций. Применение при ионообменной хроматографии летучих буферов дает возможность избежать трудоемкой процедуры обессоливания, которая осложняла ранее предложенные методики [49, 92]. Большим достижением в области ионообменной хроматографии является введение сферических смол. Их применение способствует увеличению скорости потока фракционируемых веществ через колонку и значительно сокращает продолжительность препаративного разделения. Сферические смолы в автоматических аминокислотных анализаторах обеспечивают воспроизводимую сравнительную хроматографию пептидов с высокой разрешающей способностью, т. е. позволяют автоматически проводить анализ методом «отпечатков пальцев».

Ключевая роль в расшифровке последовательности принадлежит определению концевых аминокислот, имеющих либо свободную NH_2 -группу на N-конце, либо свободную COOH -группу на C-конце

пептида. Именно поэтому классический метод Сэнгера явился значительным достижением в белковой химии; его принцип заключается в следующем. Анализируемый белок или пептид в очень мягких условиях обрабатывают 2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ). В результате происходит динитрофенилирование N-концевых аминокислотных групп, а также некоторых реакционноспособных боковых цепей, имеющих следующие группы: ε -NH₂, фенольные — OH, имидазольные — NH и —SH. После этого динитрофенильные (ДНФ) производные белков или пептидов подвергают кислотному гидролизу и экстрагируют эфиром α -ДНФ-аминокислоты, занимавшие в белке или пептиде N-концевое положение. После экстракции в гидролизате остаются только водорастворимые ДНФ-аргинин и ДНФ-лизин. Затем хроматографическим анализом эфирного экстракта точно устанавливают концевую аминокислоту, используя колоночную [1, 62], бумажную [46, 66], а также тонкослойную хроматографию [3].

Дансильный метод, который разработали Грей и Хартли в 1963 г. [24], во многих отношениях сходен с динитрофторбензольным методом. Основной реагент в дансильном методе — диметиламинонафтилсульфохлорид. Дансильная группировка присоединяется к тем же группам пептида, что и ДНФБ, но благодаря интенсивной флуоресценции дансильные производные могут быть обнаружены в очень малых количествах (до 10^{-4} мкмоль вещества).

Другим методом определения N-концевой аминокислоты служит *деградация фенилизотиоцианатом по Эдману* [15, 16]. Фенилизотиоцианат превращает N-концевые аминокислоты в фенилтиокарбамильные производные, отщепляющиеся в виде производных фенилтиогидантоина в условиях, при которых не повреждаются другие пептидные связи. Этот метод позволяет осуществить *постепенную деградацию* полипептидов и пептидов. Отщепившийся аминокислотный остаток можно идентифицировать хроматографией фенилтиогидантоиновых производных [76] или сопоставлением аминокислотного состава укороченных пептидов и исходного материала. В последнее время реакцию Эдмана обычно комбинируют с дансильным методом, так как в таком варианте для определения аминокислоты, занявшей концевое положение, требуется очень малое количество деградируемого пептида.

N-концевую последовательность можно также определить с помощью фермента аминополипептидазы, который специфически гидролизует N-концевые пептидные связи (т. е. связи, образуемые аминокислотой со свободной α -NH₂-группой) [77, 81]. Освободившиеся после гидролиза аминокислоты идентифицируют хроматографически.

Подобным образом с помощью карбоксипептидаз А и В можно определить C-концевые аминокислоты и *C-концевую последовательность*. Если в C-концевом положении находится основная амино-

кислота, то ее можно отщепить лишь карбоксипептидазой В [21].

Вслед за первыми работами Сэнгера в последние годы удалось расшифровать первичную структуру многих полипептидов и белков. После определения аминокислотной последовательности инсулина были расшифрованы последовательности рибонуклеазы, полипептида из вируса табачной мозаики, нескольких препаратов цитохрома *c*, различных цепей гемоглобина, ингибитора трипсина, химо-трипсиногена и химотрипсина, трипсина, глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы и т. д. Вместе с последовательностями некоторых пептидных гормонов эти данные вошли в «Атлас структуры и аминокислотной последовательности белков», который впервые был опубликован в 1966 г. и затем неоднократно переиздавался¹.

Второе издание этого атласа, опубликованное в 1967—1968 гг., вдвое больше первого и представляет собой исключительно ценную сводку результатов работ по расшифровке последовательности. Там приведены последовательности цитохрома *c*, ферредоксина, цепей гемоглобина, миоглобина, различных иммуноглобулинов и их L-цепей, трипсиногена, трипсина, химотрипсиногена, химотрипсина, субтилизина, α -лактальбумина, триптофан-синтазы, лизоцимов, рибонуклеазы, ингибитора трипсина, пептидных гормонов, ядов, токсинов, вирусных белков и т. д. Включая видовые вариации, число белков с расшифрованной структурой достигает почти двухсот.

Для решения определенных биологических проблем вовсе не обязательно расшифровка всей последовательности изучаемого белка. Например, при выяснении связи между структурой и функцией или при анализе видовой специфичности, а также при решении ряда других проблем требуется выяснить последовательность определенной части структуры того «ответственного» (marked) пептида, который непосредственно участвует в рассматриваемом процессе. В зависимости от изучаемой функции понятие «ответственный» пептид может быть достаточно широким. Это либо активный центр, либо участок связывания, либо, наконец, locus специфичности.

Выяснить локализацию «ответственного» пептида далеко не просто. Природа редко наделяет интересную с точки зрения экспериментатора структуру какой-либо меткой. Однако такая метка имеется, например, у гем-связывающего пептида цитохрома *c*. Часть пептида, непосредственно участвующая в осуществлении биологической функции, ковалентно соединена тиоэфирной связью с протетической группой цитохрома. Эта стабильная связь облегчает выделение и анализ этого пептида. Туппи и сотр. [87—91] удалось сравнить последовательности гем-связывающих пептидов, выделен-

¹ Одно из последних изданий опубликовано в 1972 г. (том 5) под редакцией Дейхоф; приложение к нему вышло в свет в 1973 г. (см. список литературы). — *Прим. ред.*

ных из цитохромов с разного видового происхождения. Некоторые из этих данных приведены в табл. 6

Таблица 6

Гем-связывающие пептиды из цитохромов с разного видового происхождения

Вид	Аминокислотная последовательность
Бык	
Лошадь	. . . Вал-Глн-Лиз-Цис-Ала-Глн-Цис-Гис-Тре-Вал-Глу-Лиз
Свинья	
Лосось	
Курица	. . . Вал-Глн-Лиз-Цис-Сер-Глн-Цис-Гис-Тре-Вал-Глу-Лиз . . .
Дрожжи	. . . Лиз-Тре-Арг-Цис-Глу-Лей-Цис-Гис-Тре-Вал-Глу . . .
<i>Rhodospirillum rubrum</i> Цис-Лей-Ала-Цис-Гис-Тре-Фен-Асп-Глу-Гли . . .

Как видно из данных табл. 6, цитохромы даже очень отдаленных видов имеют значительное сходство гем-связывающих пептидов, особенно в той части, которая включает последовательность ... Цис-Гис-Тре ... Вместе с результатами более поздних исследований эти данные подтверждают справедливость существующего в химии белков принципа «сходная структура—сходная функция».

Другой весьма примечательный пример изучения «ответственных» пептидов можно найти в истории исследования эстераз. Янсен и др. [39] обнаружили, что в эквимоллярных концентрациях диизопропилфторфосфат (ДИПФФ) способен необратимо подавлять активность некоторых протеаз и эстераз. Из гидролизатов этих ферментов удалось выделить и расшифровать структуру тех пептидов, с которыми связывается радиоактивный ингибитор. Результаты этой расшифровки представлены в табл. 7. У всех сравниваемых ферментов аминокислотные остатки, расположенные вблизи заблокированной ДИПФФ боковой цепи, содержащей серин, оказались идентичными или сходными. Это сопоставление также подтвердило справедливость принципа «сходная структура—сходная функция». В химии белков этот принцип следует принимать с известной оговоркой: аналогичной структуре не всегда соответствует тождественная функция, а чаще всего похожая или генетически близкая. Сходные структуры могут быть генетически близкими и возникать, например, от общего предшественника путем замены аминокислот в результате изменения одного основания в их кодоне.

Обработка дегидрогеназ радиоактивным иоацетатом и последующее фракционирование гидролизата позволяют определить последо-

Таблица 7

Пептиды эстераз, содержащие серин

Фермент	Последовательность	Источник данных
Химотрипсин	. . . Гли-Асп-Сер-Гли-Гли . . .	[32, 57, 73]
Трипсин	. . . Гли-Асп-Сер-Гли-Про . . .	[12]
Тромбин Асп-Сер-Гли	[22]
Эластаза Асп-Сер-Гли	[56]
Бутирилхолинэстераза	. . . Гли-Глу-Сер-Ала-Гли . . .	[40]
Ацетилхолинэстераза Гли-Сер-Ала	[70, 74]
Алиэстераза из печени лошади	. . . Гли-Глу-Сер-Ала-Гли . . .	[41]
Субтилизин	. . . Гли-Тре-Сер-Мет-Ала . . .	[71]
Протеаза из <i>Aspergillus oryzae</i> Тре-Сер-Мет-Ала . . .	[70]
Фосфолюкомутаза	. . . Тре-Ала-Сер-Гис-Асп . . .	[52]
Фосфорилаза	. . . Гли-Иле-Сер-Вал-Арг	[19]
Щелочная фосфатаза	. . . Тре-Асп-Сер-Ала-Ала . . .	[18, 75]

вательность аминокислот, расположенных вблизи реакционноспособных SH-групп в молекуле этих ферментов. Этим способом была расшифрована последовательность вблизи активного центра глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназ [30, 31, 47]. Аналогичным образом была определена последовательность того же участка лактатдегидрогеназы [23, 37]. Результаты этих исследований представлены в табл. 8.

Структурные аналогии, указанные в табл. 8, дают возможность разделить дегидрогеназы на две группы. В первую группу входят лактат- и алкогольдегидрогеназы. Вторую группу образуют оба

Таблица 8

«Активные» пептиды, содержащие цистеин, в различных дегидрогеназах

Фермент	Последовательность
Лактатдегидрогеназа сердечной ткани цыпленка	...Сер-Гли-Гли-Цис-Асп-Лей-Асп...
Алкогольдегидрогеназа дрожжей	...Тре-Гли-Вал-Цис-Гис-Тре-Асп...
Алкогольдегидрогеназа печени	...Сер-Гли-Иле-Цис-Арг-Сер-Асп...
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	...Асп-Ала-Сер-Цис-Тре-Тре-Асп...
Глицерофосфатдегидрогеназа	...Вал-Асп-Тре-Цис-Сер-Гли...

вида триозодегидрогеназ. Наши сегодняшние знания о функции этих ферментов, несмотря на противоречивость, в известной мере подтверждают такую классификацию. Например, довольно определенно показано, что реакционноспособные SH-группы включенных в таблицу двух триозодегидрогеназ сходным образом принимают участие в образовании промежуточного комплекса — ацилированного фермента. Обе триозодегидрогеназы в соответствующих участках структуры аналогичны одна другой, но не имеют сходства с ферментами первой группы. Таким образом, структурной аналогии действительно сопутствует функциональное сходство.

Цитированная литература

1. Bailey K., *Biochem. J.*, **49**, 23 (1951).
2. Bovey F. A., Yanari S. S., in: Boyer P., Lardy H., Myrbäck K., *The Enzymes*, Academic Press, New York (1960).
3. Brenner M., Niederwieser A., Pataky G., *Experientia*, **17**, 145 (1961).
4. Butler P. J. E., Harris J. I., Hartley B. S., Leberman R., *Biochem. J.*, **112**, 679 (1961).
5. Cecil R., Loening U. E., *Biochem. J.*, **76**, 146 (1960).
6. Colvin J., Smith D. B., Cook W. M., *Chem. Rev.*, **54**, 687 (1954).
7. Desnuelle P., in: Boyer P., Lardy H., Myrbäck K., *The Enzymes*, Academic Press, New York (1966).
8. Dévényi T., *Magyar Kém. Folyóirat*, **69**, 538 (1963).
9. Dévényi T., *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 429; **4**, 297 (1968, 1969).
10. Dévényi T., Sajgó M., Horváth E., Szőényi B., *Magyar Kém. Folyóirat*, **70**, 123 (1964).
11. Dinh van Hoang, Rovey M., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 188 (1963).
12. Dixon G. H., Kauffmann D. L., Neurath M., *J. Biol. Chem.*, **233**, 1373 (1958).
13. Dixon H. B. F., Perham R. N., *Biochem. J.*, **109**, 312 (1968).
14. Dlouha V., Keil B., Sorm F., *Coll. Czechoslov. Chem. Commun*, **28**, 2969 (1963).
15. Edman P., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283 (1950).
16. Edman P., *Acta Chem. Scand.*, **7**, 700 (1953).
17. Edmundson A. B., *Nature*, **198**, 354 (1963).
18. Engström L., *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 606 (1962).
19. Fisher E. H., Graves D. J., Crittenden E. R. S., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1698 (1959).
20. Flodin P., *J. Chromatogr.*, **5**, 103 (1961).
21. Gladner J. A., Folk J. E., *J. Biol. Chem.*, **231**, 393 (1957).
22. Glander J. A., Laki K., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1263 (1958).
23. Gold A. H., Segal H., *Biochemistry*, **4**, 1506 (1965).
24. Gray W. R., Hartley R. S., *Biochem. J.*, **89**, 379 (1963).
25. Gross D., *Nature*, **176**, 72 (1955).
26. Gross E., Witkop B., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1510 (1961).
27. Gross E., Witkop B., *J. Biol. Chem.*, **237**, 1856 (1962).
28. Hagihara B., in: Boyer P., Lardy H., Myrbäck K., *The Enzymes*, Academic Press, New York, **4**, 193 (1960).
29. Hamilton P. B., *Anal. Chem.*, **35**, 2055 (1963).
30. Harris J. I., *Nature*, **203**, 30 (1964).

31. Harris J. I., Meriwether P. B., Park J. H., Nature, **198**, 154 (1963).
32. Hartley B. S., J. Cell and Compar Physiol., **54**, 203 (1959).
33. Hartley B. S., VI Междунар. биохим. конгр., IV Симпоз. Изд-во АН СССР, М. (1962).
34. Hill R. L., Adv. Protein Chem., **37**, 107 (1965).
35. Hirs C. H. W., J. Biol. Chem., **219**, 611 (1956).
36. Hoffmann T., Walsh K. A., Kauffmann D., Neurath H., Fed. Proc., **22**, 528 (1963).
37. Holbrook J. J., Pfeleiderer G., Schnetger J., Diemair S., Biochem. Z., **344**, 1 (1966).
38. Hubbard R. W., Kremer D. M., Anal. Biochem., **12**, 593 (1965).
39. Jansen E. F., Curl A. L., Laurence A., Balls A. K., J. Biol. Chem., **179**, 189 (1949).
40. Jansz H. S., Brons D., Biochim. Biophys. Acta, **33**, 396 (1959).
41. Jansz H. S., Brons D., Warringa M. G., Biochim. Biophys. Acta, **34**, 573 (1959).
42. Lai C. Y., Arch. Biochim. Biophys., **128**, 22 (1968).
43. Larsen I., Scientific Tools, **12**, 24 (1965).
44. Laith G. H., Ruthaven G. R. J., Biochim. J., **62**, 665 (1965).
45. Lawson W. B., Gross E., Folitz C. H., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., **85**, 1509 (1961).
46. Levy A., Nature, **174**, 126 (1954).
47. Li T. K., Vallee B. L., Biochemistry, **3**, 869 (1964).
48. Lindley H., J. Am. Chem. Soc., **77**, 4027 (1956).
49. Margoliash E., J. Biol. Chem., **237**, 2161 (1961).
50. Michl M., Monatsh. Chemie, **82**, 489 (1951).
51. Mikeš O., Coll. Czechoslov. Chem. Commun., **22**, 831 (1957).
52. Milstein C., Sanger F., Biochim. J., **79**, 456 (1961).
53. Monier R., Jutisz M., Bull. Soc. Chim. Biol., **32**, 228 (1950).
54. Moore S., Bergmann M., J. Biol. Chem., **154**, 191 (1944).
55. Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., **176**, 367 (1948).
56. Naughton M. A., Sanger F., Hartley B. S., Shaw D. C., Biochim. J., **77**, 149 (1960).
57. Oesterbaan R. A., van Andrichen M. E., Biochim. Biophys. Acta, **27**, 423 (1958).
58. Patchornik A., Lawson W. B., Cross E., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., **82**, 5923 (1960).
59. Pechere J. F., Dixon G. H., Maybury R. H., Neurath H., J. Biol. Chem., **233**, 1364 (1968).
60. Piez K. A., Morris L., Anal. Biochem., **1**, 187 (1960).
61. Porath J., Flodin O., Nature, **183**, 1657 (1959).
62. Porter R. R., Sanger F., Biochem. J., **42**, 287 (1948).
63. Raftery M. A., Cole R. D., Biochem. Biophys. Res. Commun., **10**, 464 (1963).
64. Ramachandran L. K., Witkop B., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4028 (1959).
65. Rees M. W., Biochem. J., **40**, 632 (1946).
66. Rovey M., Fabre S., Bull. Soc. Chim. Biol., **35**, 541 (1953).
67. Rydon H. N., Smith P. W. G., Nature, **169**, 922 (1952).
68. Sajgó M., Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., **4**, 385 (1969).
69. Sajgó M., FEBS Lett., **12**, 349 (1971).
70. Sanger F., Proc. Chem. Soc., p. 76 (1963).
71. Sanger F., Shaw D. C., Nature, **187**, 872 (1960).
72. Sanger F., Tuppy H., Biochem. J., **49**, 463; 481 (1951).
73. Schaffer N. K., Hermann S., Engle R. J., J. Biol. Chem., **214**, 799 (1955).
74. Schaffer N. K., May C. S., Summerson W. H., J. Biol. Chem., **206**, 201 (1954).
75. Schwartz J. H., Crestfield A. M., Lipmann T., Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) **49**, 722 (1963).

76. *Siðquist J.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 20 (1960).
77. *Smith E. L.*, *Fed. Proc.*, **16**, 801 (1957).
78. *Smith E. L.*, *Kimmel J. R.*, in: *Boyer P.*, *Lardy H.*, *Myrbäck K.*, *The Enzymes*, Academic Press, New York, 133 (1960).
79. *Sosakowa S.*, *J. Biochem. (Tokyo)*, **53**, 188 (1963).
80. *Spackman D. H.*, *Fed. Proc.* **22**, 244 (1963).
81. *Spackman D. H.*, *Smith E. L.*, *Brown D. M.*, *J. Biol. Chem.*, **212**, 255 (1955).
82. *Synge R. L. M.*, *Chem. Rev.*, **32**, 135 (1943).
83. *Synge R. L. M.*, *Tiselius A.*, *Biochem. J.*, **46**, P41 (1950).
84. *Tallan H. H.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 407 (1958).
85. *Thompson E. O. P.*, *Biol. Chem.*, **207**, 563 (1954).
86. *Toennies G.*, *Homiller R. P.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 3054 (1942).
87. *Tuppy H.*, *Z. Naturforsch.*, **12b**, 784 (1957).
88. *Tuppy H.*, *Naturwissenschaften*, **46**, 35 (1959).
89. *Tuppy H.*, *Bodó G.*, *Monatsh. Chemie*, **85**, 807, 1024, 1182 (1954).
90. *Tuppy H.*, *Dus K.*, *Monatsh. Chemie*, **89**, 407 (1958).
91. *Tuppy H.*, *Peleus S.*, *Acta Chem. Scand.*, **9**, 363 (1955).
92. *Vanecek J.*, *Meloun B.*, *Kostka V.*, *Keil B.*, *Šorm F.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 169 (1960).

Рекомендуемая литература

- Colowick S. P.*, *Kaplan N. O.* eds., *Methods in Enzymology*, vol. XXV, Academic Press, New York, London, 1972.
- Dayhoff M. O.*, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, 1972, Suppl. 1, Natl. Biomed. Res. Foundation Georgetown Univ. Med. Centr. Washington D. C., 1973.
- Needleman S. B.* ed., *Protein Sequence Determination*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970.

Глава II

АНАЛИЗ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ НИЗКОВОЛЬТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

А. НИЗКОВОЛЬТНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА БУМАГЕ [11]

Принцип метода. Компоненты белковой смеси, нанесенные на специальную фильтровальную бумагу, смоченную буферным раствором, мигрируют в электрическом поле в направлении и со скоростью, зависящими от заряда их молекул. В результате смесь делится на фракции, которые можно выявить специальными методами окрашивания и измерить количественно.

Область применения: качественный и количественный анализ белковых смесей; качественный и количественный анализ белков сыворотки, мочи, спинномозговой и тканевой жидкостей.

1. ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

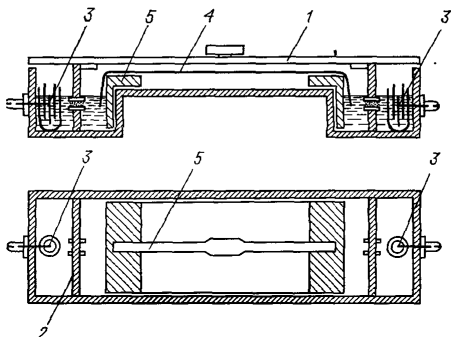
ОБОРУДОВАНИЕ

Аппарат для электрофореза. Схема электрофоретического аппарата представлена на фиг. 1. Он состоит из пластмассовой камеры с плотно прилегающей стеклянной крышкой 1. Обе электродные камеры перегородкой из пластика 2 разделены на два отсека. В наружных отсеках 3 расположены платиновые электроды диаметром 0,5—0,8 мм. В каждый из двух внутренних отсеков погружаются концы фильтровальной бумаги 4. В середине перегородки, которая разделяет наружный и внутренний отсеки электродной камеры, на высоте 40 мм расположено соединяющее их отверстие. Это отверстие (0,5 см в диаметре) неплотно закрыто стеклянной ватой.

В электрофоретической камере находится съемная пластмассовая рамка 5, на которую укладываются полоски фильтровальной бумаги.

Источник тока. Стабилизированный источник питания дает постоянный ток 100 мА и напряжение до 300 В.

Сосуд для окрашивания. Окрашивание полосок фильтровальной бумаги проводят в стеклянном сосуде с крышкой размером 7 × 38 см.



Фиг. 1. Схема прибора Грассмана—Ханнига для электрофореза на бумаге [11].

Описание см. в тексте.

ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

1. *Приготовление буферного раствора.* 29,43 г веронала и 19,43 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют примерно в 1 л дистиллированной воды, затем прибавляют 180 мл 0,1 н. HCl и дистиллированной водой доводят объем до 3 л. Буферный раствор должен иметь рН 8,6.

2. *Заполнение электрофоретической камеры буферным раствором.* В каждый отсек электрофоретической камеры заливают примерно по 500 мл буферного раствора. Во всех отсеках аппарата буферный раствор должен достигать одного и того же уровня.

3. *Смачивание полосок фильтровальной бумаги буферным раствором.* Перед смачиванием на полоске фильтровальной бумаги карандашом отмечают место, соответствующее концу рамки и место нанесения образца. После этого бумажные полоски равномерным движением погружают и проводят через буферный раствор, заполняющий стеклянный сосуд. Для погружения концы полоски берут пинцетами, правый конец погружают в буферный раствор, а затем медленно вытягивают его наверх, постепенно погружая в раствор левый конец полоски. Полоску нужно продвигать со скоростью, с которой происходит ее смачивание буферным раствором. После смачивания полоску извлекают из буферного раствора в вертикальном положении и некоторое время ждут, пока стекнут последние капли. Затем полоску с обеих сторон промокают несколькими слоями фильтровальной бумаги, лишь слегка прикасаясь к ней, чтобы не

выдавить влагу. Мокрые полоски укладывают на рамку согласно ранее сделанным отметкам.

4. *Нанесение исследуемого материала (сыворотки).* На отмеченную стартовую линию смоченной полоски пипеткой наносят 0,01 мл нормальной сыворотки, содержащей 5,6—8% белка.

Способ нанесения сыворотки. Анализируемый материал наносят пипеткой поперек полоски, на 3 мм отступая от каждого ее края. Для этого пипетку медленно и равномерно передвигают по стартовой линии, слегка прикасаясь кончиком к бумаге. Кончик пипетки должен быть гладким, чтобы не поцарапать бумагу; осторожного прикосновения к бумаге вполне достаточно для того, чтобы исследуемый материал впитался.

5. *Электрофорез.* Полоску фильтровальной бумаги кладут на рамку в электрофоретической камере таким образом, чтобы оба ее конца, выходящие за рамку, были погружены в буферный раствор (фиг. 1). После укладывания полосок камеру закрывают стеклянной крышкой и аппарат включают в электросеть. Электрофорез продолжается от 12 до 16 ч при 110 В и силе тока около 1 мА на полосу.

6. *Извлечение и высушивание бумажных электрофореграмм.* Когда закончится разделение фракций, электрический ток выключают и осторожно поднимают стеклянную крышку аппарата. Нужно следить, чтобы скопившийся на внутренней поверхности крышки конденсат не попал на полоски бумаги. Рамку с полосками извлекают из электрофоретической камеры и помещают в проволочную корзинку так, чтобы концы полосок, ранее лежавшие у края рамки, теперь располагались бы на краях корзинки. Затем корзинку с полосками ставят в сушильный шкаф с температурой 110° С до тех пор, пока не высохнет бумага. При этой температуре белки денатурируют и фиксируются на бумаге.

7. *Окрашивание бумажных электрофореграмм.* Разделенные при электрофосрезе белковые фракции выявляют на бумажных полосках с помощью окрашивания амидовым черным.

Окрашивающий раствор. Готовят насыщенный на холоду раствор амидового черного в растворителе, содержащем смесь ледяная уксусная кислота — метанол (1:9). Для этого примерно 13,0 г амидового черного растворяют в 100 мл уксусной кислоты и прибавляют 900 мл метанола. Смесь тщательно перемешивают встряхиванием и оставляют отстаиваться на ночь; на следующий день ее фильтруют. Одна и та же порция красителя может быть использована несколько раз.

Отмывающий раствор: уксусная кислота — метанол (1:9).

Методика окрашивания. Сосуд для окрашивания заполняют раствором красителя и погружают в него бумажные электрофореграммы, фиксированные нагреванием. Окрашивание проводят в тече-

ние 10 мин при постоянном перемешивании, затем раствор красителя заменяют на отмывающий раствор. В течение примерно 4 ч несколько раз производят смену раствора до тех пор, пока свежая его порция не останется бесцветной.

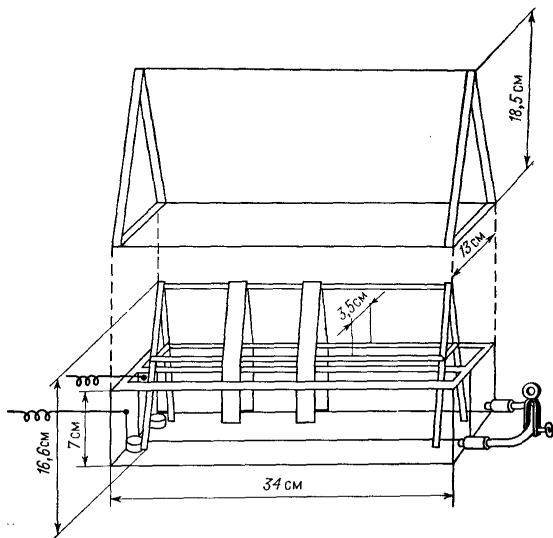
ПРИМЕЧАНИЯ

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ КАМЕРА

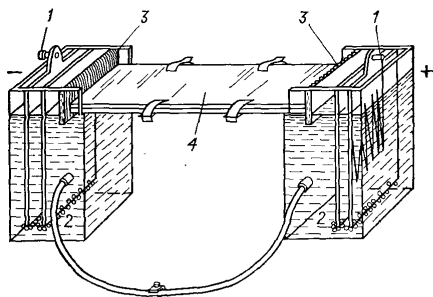
Кроме прибора Грассмана — Ханнига, применяются также электрофоретические камеры других типов. Схемы двух из них представлены на фиг. 2 и 3.

А. Камера Даррема [6]. Этот прибор удобен для серийных анализов (фиг. 2).

Б. Камера Канкеля — Тизелиуса [18]. В этом приборе полоски бумаги для электрофореза помещаются между двумя силиконизированными пластмассовыми пластинами, которые устраняют нежелательное испарение буферного раствора, что препятствует изменению его концентрации. Кроме того, этот прибор пригоден и для двумерного электрофореза (фиг. 3).



Фиг. 2. Прибор Даррема для электрофореза на бумаге [6].



Фиг. 3. Прибор Канкеля—Тизелиуса для электрофореза на бумаге [18].
1 — электроды; 2 — слой стеклянной ваты в щели между отсеками; 3 — фитиль из фильтровальной бумаги; 4 — плексигласовая пластинка.

В. Камера «Элфор» (Bender-Hobein, ФРГ). Пластмассовая камера «Элфор» широко используется для повседневной работы в клинических лабораториях. Прибор обеспечивает постоянную величину рН в ходе электрофореза. Этому способствует специально подобранное соотношение объемов электродных и аналитической камер, особый способ укладки бумажных полосок и оригинальное лабиринтное устройство вокруг электродов. Укладка бумажных полосок производится очень просто: они сами прилипают ко всей поверхности поддерживающего съемного мостика.

БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

А. Буферные растворы, которые используются для электрофореза сывороточных белков, должны иметь рН между 8,0 и 9,0. Именно при этих значениях рН белки мигрируют к аноду (изоэлектрические точки разных белков сыворотки находятся в диапазоне рН от 4,7 до 7,0).

Б. Ионная сила буферных растворов должна быть в пределах 0,06—0,1 μ . Разбавленные растворы с ионной силой ниже 0,06 μ не обладают достаточной буферной емкостью и не обеспечивают четкого разделения белковых фракций.

В. С практической точки зрения важно отметить, что, повышая напряжение при электрофорезе, можно работать с растворами низкой ионной силы. Это снизит теплообразование под влиянием электрического тока, но разделение белков будет не очень четким. При повышении ионной силы разделение проходит гораздо лучше.

Г. Помимо указанных выше буферных растворов, для электрофореза белков и пептидов можно использовать следующие:

1) Буферный раствор барбитурат натрия — барбитуровая кислота: 10,3 г барбитурата натрия растворяют в 1000 мл дистиллированной воды и прибавляют 1,84 г барбитуровой кислоты, также растворенной в 1000 мл дистиллированной воды; при этом получается буферный раствор pH 8,6, $\mu = 0,06$.

2) Буферный раствор барбитурат натрия — уксуснокислый натрий: 7,36 г барбитурата Na и 3,86 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 1100 мл дистиллированной воды; pH 9,0, $\mu = 0,06$.

3) Боратный буферный раствор: 8,8 г борнокислого натрия и 4,05 г борной кислоты растворяют в 1000 мл дистиллированной воды; pH 8,6.

4) Буферный раствор трис—ЭДТА [1]. Этот раствор лучше других подходит для разделения белков сыворотки. В нем можно выделить 9 фракций: преальбумин, альбумин, три фракции α -глобулинов, три фракции β -глобулинов и γ -глобулин.

Приготовление буферного раствора. 60,5 г три(оксиметиламинометана) (трис), 6,0 г ЭДТА и 4,6 г борной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят до конечного объема 1000 мл. Молярности растворенных веществ соответственно составляют 0,5; 0,021 и 0,075 M, а pH равен 8,9.

Д. Буферные растворы легко прорастают плесневой или бактериальной флорой. Следует тщательно избегать бактериального загрязнения и не применять проросшие растворы.

Е. Буферные растворы следует хранить в холодильнике. Нецелесообразно запасаться готовыми растворами в объеме, превышающем недельную потребность, так как срок их хранения не более 8—10 дней. После каждого сеанса электрофореза необходимо сменить полюса либо тщательно перемешать в бутылки буферные растворы из анодного и катодного отсека и вновь залить в аппарат. Даже выполняя это требование, не следует использовать одну и ту же порцию буферного раствора более 3—4 раз.

НАНЕСЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМОГО ОБРАЗЦА

Нижe описаны два весьма удобных способа нанесения анализируемого образца на полоску фильтровальной бумаги.

А. Капиллярной пипеткой исследуемый раствор белка переносят на шлифованный край предметного стекла, затем быстрым движением прикладывают этот край стекла к полоске бумаги и держат до тех пор, пока весь раствор не впитается в бумагу. С помощью предметного стекла шириной 2,5 см можно нанести 0,05 мл исследуемого раствора.

Б. Из плексигласа или другого подходящего пластика изготавливают U-образную вилку, ветви которой на 6—8 см расходятся друг

от друга. Между концами ветвей натягивают две платиновые проволочки толщиной 0,1 мм так, чтобы между ними остался зазор 0,5 — 1,0 мм. Капиллярной пипеткой заполняют пространство между проволочками исследуемым раствором и, перевернув вилку, быстрым движением прикасаются проволочками к поверхности смоченной полоски бумаги.

НАПРЯЖЕНИЕ ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ

А. В стандартных условиях опыта (те же самые бумага, буферный раствор и аппарат) миграция белков в электрическом поле зависит от напряжения.

Б. Обычно для фракционирования белков сыворотки используют рекомендованное выше напряжение 110 В, при котором разделение длится от 14 до 16 ч, и охлаждения не требуется. Для особых целей напряжение может быть увеличено, но, согласно закону Джоуля, при этом соответственно увеличится теплообразование. Выделение тепла можно уменьшить, если снизить ионную силу раствора. При достаточной влажности фильтровальной бумаги, на которой ведут электрофорез, и не очень высокой температуре окружающего воздуха можно повысить напряжение на полоске до 250—300 В, не принимая специальных мер для охлаждения. Однако при дальнейшем увеличении напряжения требуются специальные приспособления для охлаждения.

НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

А. *Электроосмос.* При прохождении электрического тока в капиллярной системе (фильтровальная бумага), заполненной буферным раствором, наблюдается явление электроосмоса, т. е. движение буферного раствора к катоду навстречу миграции белков.

Б. *Факторы, влияющие на перетекание буферного раствора:*

1) После погружения концов полоски влажной фильтровальной бумаги в буферный раствор, заполняющий отсеки электрофоретического аппарата, начинается перетекание этого раствора из отсека в отсек по смоченным полоскам, которое продолжается от 30 до 60 мин, пока не наступит равновесие. Если полоски бумаги были предварительно хорошо смочены, то период уравнивания может быть короче.

Чтобы полностью устранить влияние этого процесса на разделение белков, следует уложить смоченные буферным раствором полоски бумаги на рамку, поместить их в электрофоретическую камеру и закрыть крышку. Только после того как равновесие установится, т. е. примерно через 30 мин, можно наносить исследуемый образец.

2) Возникающее по закону Джоуля тепло увеличивает испаре-

ние буферного раствора с поверхности бумаги. Испарение приводит к концентрированию буферного раствора, увеличение ионной силы повышает его удельную электропроводность, а это в свою очередь опять-таки ведет к нагреванию и испарению раствора. Испарившийся буферный раствор восполняется раствором из отсеков аппарата, поступающим благодаря капиллярным силам, т. е. начинается движение раствора по направлению от концов полоски к ее центру. На одном конце полоски направление этого потока совпадает с миграцией белков, а на другом конце увлекает их в противоположную сторону.

Нежелательные эффекты и интенсивность этих противоположно направленных потоков в принципе минимальны, так как в герметизированном приборе для электрофореза быстро создаются условия *влажной камеры*. Кроме того, конструкция некоторых аппаратов для электрофореза предусматривает впускной штуцер для введения пара в электрофоретическую камеру, что позволяет начать электрофорез в насыщенном паром атмосфере.

В результате испарения буферного раствора на внутренней поверхности стеклянной крышки, закрывающей электрофоретическую камеру, происходит конденсация воды и образование капель. Опасности попадания капель воды на электрофореграмму во время опыта или при удалении крышки можно легко избежать, если внутреннюю поверхность крышки покрыть листом фильтровальной бумаги.

3) Если заполняющий отсеки электрофоретической камеры буферный раствор находится на разных уровнях, то из отсека с более высоким уровнем он перетекает по бумажным полоскам в отсек с более низким уровнем. Этот поток буферного раствора в зависимости от направления может либо тормозить, либо ускорять миграцию белков.

Чтобы избежать перетекания, следует тщательно выравнивать уровни буферного раствора во всех отсеках электрофоретической камеры до внесения в нее бумажных полосок. Обычно отсеки приборов для электрофореза снабжены отводными кранами, которые соединяются резиновым шлангом. После заполнения прибора буферным раствором отводные краны открывают (или, если кранов нет, снимают зажим с соединяющего отсеки резинового шланга), и происходит выравнивание уровней.

Еще проще добиться одинаковых уровней с помощью Т- или У-образной трубки, имеющей на концах резиновые шланги и заполненной буферным раствором. Два ее конца погружают в буферные отсеки электрофоретической камеры, а через третий отвод насаживают буферный раствор. Когда раствор заполнит трубку, этот отвод перекрывают зажимом.

4) Прежде чем начинать работу с данным прибором для электрофореза, следует эмпирически установить, в какое место бумажной полоски нужно наносить исследуемый образец, чтобы получать наилучшее разделение.

ВЫБОР ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГИ

Хорошо себя зарекомендовали на практике следующие фирменные марки фильтровальной бумаги для электрофореза: Шляйхер-Шуль 2043а, Шляйхер-Шуль 2043b, Ватман 1, Ватман 4, Мунктель 20, Махери-Нагель 214.

АДСОРБЦИЯ БЕЛКОВ НА ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГЕ

А. Во время электрофореза некоторые белки адсорбируются на фильтровальной бумаге. Адсорбция белка бывает значительной при кислом рН и низкой ионной силе раствора, но наблюдается также и при рН 8,6. Адсорбция происходит в результате взаимодействия положительно заряженных молекул белка и отрицательно заряженных волокон фильтровальной бумаги. Степень адсорбции разных белков широко варьирует; например, липопроотеиды сыворотки крови адсорбируются сильнее, чем сывороточный альбумин.

Б. В результате адсорбции некоторые мигрирующие белки связываются с бумагой, что приводит к образованию «хвостов».

В. Из-за образования «хвостов» белковые фракции, полученные при электрофорезе, нельзя считать чистыми, так как они могут содержать следы других фракций. Образование «хвостов» снижает точность количественной оценки электрофореграмм и значительно затрудняет анализ малых количеств белка. В последнем случае рекомендуется проводить электрофорез исследуемого белка в смеси с другим белковым раствором. Например, можно смешать раствор альбумина низкой концентрации с сывороткой и провести электрофорез этой смеси и отдельно сыворотки на двух соседних полосках. Разница между содержанием альбумина на двух полосках будет соответствовать его концентрации в исследуемом растворе.

2. МЕТОДИКИ ОКРАШИВАНИЯ

Различные методики окрашивания фиксированных нагреванием электрофореграмм позволяют не только выявить, но и количественно измерить различные белковые фракции. Кроме методик окрашивания белка, существуют также способы окрашивания липидных и углеводных компонентов липопроотеидов и гликопроотеидов.

ОКРАШИВАНИЕ БЕЛКОВ

ОКРАШИВАНИЕ БЕЛКОВ АМИДОВЫМ ЧЕРНЫМ

1) *Очистка амидового черного* [14]. 10,0 г чистого амидового черного растворяют в 900 мл дистиллированной воды, а затем осаждают, прибавив 100 мл концентрированной соляной кислоты. Надо-

сачочную жидкость сливают, а осадок отмывают в 1000 мл 10%-ной HCl, после чего его помещают на фильтр и отмывают холодной дистиллированной водой до тех пор, пока в фильтрате не исчезнет голубое окрашивание. Затем осадок красителя переносят в химический стакан, суспендируют в дистиллированной воде и доводят pH суспензии до 6,5 с помощью NaOH. После этого нагревают до кипения, охлаждают и, проверив pH, высушивают на водяной бане. Из очищенного таким образом красителя готовят окрашивающий раствор.

2) *Окрашивание по Грассману и Ханнигу* [11] (см. стр. 48).

3) *Окрашивание по методу Пукара* [23]. *Окрашивающий раствор*: 1,0 г амидового черного растворяют в смеси 90 мл метанола и 10 мл ледяной уксусной кислоты.

Отмывающий раствор: 5%-ная уксусная кислота.

Методика. Фиксированные электрофореграммы сворачивают, на 2—3 мин погружают в нагреваемый на водяной бане до кипения метанол, а затем 4 мин окрашивают раствором амидового черного, имеющим температуру 80° С. После окрашивания полоски расплавляют на стекле, оставляют на 5 мин и затем промывают в отмывающем растворе, нагретом до 80° С, пока не удалят избыток красителя.

ОКРАШИВАНИЕ БЕЛКОВ КИСЛЫМ ФУКСИНОМ

Окрашивающий раствор: 2,0 г кислого фуксина растворяют в смеси, состоящей из 500 мл метанола, 400 мл дистиллированной воды и 100 мл ледяной уксусной кислоты.

Дифференцирующий раствор: смешивают 500 мл метанола, 400 мл дистиллированной воды и 100 мл ледяной уксусной кислоты.

Отмывающий раствор: 10%-ная уксусная кислота.

Методика. Фиксированные нагреванием электрофореграммы на 15 мин погружают в окрашивающий раствор, а затем на 15 мин переносят в дифференцирующий раствор. После этого, каждые 20 мин меняя отмывающий раствор, электрофореграммы промывают до тех пор, пока участки бумаги, не содержащие белка, полностью не освободятся от красителя.

Возможность полного удаления не связывающегося с белком фуксина из бумаги является преимуществом этого метода, особенно удобного при количественном определении фракций с помощью элюирования (см. стр. 60). Одну и ту же порцию окрашивающего или дифференцирующего растворов можно использовать 4—5 раз. При первых отмывках новой серии электрофореграмм можно использовать последние порции отмывающего раствора из предыдущей процедуры окрашивания.

ОКРАШИВАНИЕ БЕЛКОВ БРОМФЕНОЛОВЫМ СИНИМ [3]

Окрашивающий раствор: 1%-ный раствор бромфенолового синего в этаноле, насыщенном HgCl_2 .

I дифференцирующий раствор: метанол, содержащий 1% HgCl_2 .

II дифференцирующий раствор: этанол, содержащий 1% HgCl_2 .

Отмывающий раствор: метанол.

Методика. Фиксированные электрофореграммы на 5 мин погружают в окрашивающий раствор, переносят в I дифференцирующий раствор, а потом на 15 мин во II дифференцирующий раствор. После этого бумагу отмывают чистым метанолом. При необходимости можно очень быстро высушить электрофореграммы, погружая их в эфир и извлекая на воздух. Вместо метанола отмывающим раствором может служить 0,5%-ная уксусная кислота.

ОКРАШИВАНИЕ БЕЛКОВ ПУНЦОВЫМ КРАСНЫМ [24]

Окрашивающий раствор: насыщенный раствор пунцового красного 2R в смеси 50%-ный метанол — ледяная уксусная кислота (9:1).

Отмывающий раствор: смесь 50%-ный метанол — ледяная уксусная кислота (9:1).

Методика. Окрашивание продолжается 10 мин, затем электрофореграммы отмывают до полного удаления несвязавшегося красителя.

ОКРАШИВАНИЕ БЕЛКОВ АЗОКАРМИНОМ [17]

Окрашивающий раствор: 0,25%-ный раствор азокармина в смеси метанол — уксусная кислота (9:1).

Отмывающий раствор: смесь метанол — уксусная кислота (9:1).

Методика. Окрашивание продолжается 10 мин, затем электрофореграммы отмывают до полного удаления несвязавшегося красителя, каждые 15 мин меняя отмывающий раствор.

ОКРАШИВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ

ОКРАШИВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ СУДАНОМ ЧЕРНЫМ
(МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ В НАШЕЙ ЛАБОРАТОРИИ)

Основной раствор красителя: 500 мг судана черного 10B растворяют в 500 мл метанола.

Окрашивающий раствор: к 100 мл основного раствора красителя прибавляют 180 мл метанола и 120 мл дистиллированной воды.

Методика. Фиксированные нагреванием электрофореграммы на 60 мин погружают в окрашивающий раствор и затем отмывают в про-

точной водопроводной воде до полного удаления несвязавшегося красителя.

Основной и окрашивающий растворы следует хранить в темноте в плотно закупоренных бутылках и обязательно фильтровать через бумагу перед употреблением. Основной раствор лучше использовать не сразу после приготовления, а после того как он постоит 6—8 дней. Одну и ту же порцию окрашивающего раствора можно применять 4—5 раз. Затем происходит выпадение красителя в осадок, темносиний оттенок раствора становится черным, и при фильтрации гранулы красителя остаются на фильтре.

Судан черный 10В окрашивает липопротениды в синий цвет. Обычно фон, т. е. участки электрофореграммы, не содержащие липопротенидов, не удается отмыть до абсолютно белого цвета, так как краситель нельзя полностью удалить из бумаги. Об этом не следует забывать при определении содержания липопротенидов методом элюирования (см. стр. 60).

ОКРАШИВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ СУДАНОМ ЧЕРНЫМ ПО СВАНУ [28]

Основной раствор красителя: 0,1 г чистого судана черного растворяют в 100 мл 60%-ного этанола, подогревая на кипящей водяной бане. После охлаждения раствор красителя дважды фильтруют через мелкопористый бумажный фильтр.

Методика. Электрофореграммы на 3 ч погружают в окрашивающий раствор, затем отмывают в течение 45 мин в трех порциях 50%-ного этанола и высушивают на воздухе.

ОКРАШИВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ ЖИРОВЫМ КРАСНЫМ [12]

Окрашивающий раствор: 0,4 г чистого жирового красного растворяют в 1000 мл 60%-ного этанола, нагревая до кипения в колбе с обратным холодильником. Затем смесь оставляют на ночь при 30° С на магнитной мешалке. В заключение раствор фильтруют при 39° С.

Методика. Фиксированные нагреванием электрофореграммы на 18 ч погружают в окрашивающий раствор, нагретый до температуры 30° С, затем для удаления этанола в течение 2 мин промывают проточной водопроводной водой и высушивают при комнатной температуре. Окрашивание при температуре ниже 30° С приводит к выпадению красителя в осадок. Липопротениды окрашиваются в красный цвет на розовом фоне.

ВЫЯВЛЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ОКРАШЕННОЙ СЫВОРОТКИ [5]

К 1 мл сыворотки в вассермановской пробирке медленно прибавляют 0,1 мл насыщенного раствора ацетилированного судана черного В в 95%-ном этаноле, тщательно перемешивают и оставляют

на 30 мин. Затем удаляют избыток этанола, продувая над сывороткой воздух. Во время окрашивания возможно выпадение осадка красителя, который легко удаляется центрифугированием.

8 мкл окрашенной сыворотки наносят на полоску фильтровальной бумаги и подвергают электрофорезу в буферном растворе Михаэлиса pH 8,6, $\mu = 0,05$. Хорошо разделившиеся фракции α - и β -липопротеидов образуют зоны, окрашенные в синий цвет на белом фоне электрофореграммы.

Примечания. На бумаге Махери-Нагель 214 при напряжении 300 В в аппарате для зонального полумикроэлектрофореза можно полностью разделить липопротеиды за 1,5 ч.

Ацелирование судана черного 10В [19]. К 60 мл пиридина добавляют 40 мл уксусного ангидрида. В эту смесь вносят 2,0 г судана черного 10В и оставляют на ночь. Затем дистиллированной водой доводят объем смеси до 3 л, собирают выпавший в осадок краситель, высушивают его и растворяют в ацетоне.

ОКРАШИВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИДОВ

Сывороточные гликопротеиды выявляются толуидиновым синим, который дает с ними метакроматическое окрашивание, или в цветной реакции с иодной кислотой и реактивом Шиффа (ШИК-реакция).

ОКРАШИВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИДОВ ТОЛУИДИНОВЫМ СИНИМ [2]

Реактивы. 1) 1, 2 г иодной кислоты растворяют в 30 мл дистиллированной воды и добавляют 15 мл 0,5 М раствора уксуснокислого натрия и 100 мл 96%-ного этанола. Этот реактив следует готовить непосредственно перед употреблением.

2) *Дифференцирующий раствор:* к 100 мл метанола добавляют 20 мл ледяной уксусной кислоты и 80 мл дистиллированной воды.

3) Бромная вода.

4) 1%-ный водный раствор толуидинового синего.

5) 4%-ный раствор молибденовокислого аммония.

6) Ацетон.

Методика. Фиксированные нагреванием электрофореграммы на 15 мин погружают в свежеприготовленный реактив (1), затем на 15 мин переносят в бромную воду (3). После этого электрофореграммы ополаскивают водопроводной водой и на 30 мин погружают в окрашивающий раствор толуидинового синего (4). Затем окрашивающий раствор сливают и в течение 30—40 мин электрофореграммы промывают проточной водопроводной водой до полного удаления несвязавшегося красителя. Потом их фиксируют 3 мин в растворе (5) и на 15 мин погружают в дифференцирующий раствор (2). В результате на

красновато-фиолетовом фоне отчетливо видны синие фракции гликопротеидов. Окрашивание завершается двухминутным погружением в ацетон и высушиванием на воздухе.

ОКРАШИВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИДОВ ИОДНОЙ КИСЛОТОЙ — РЕАКТИВОМ ШИФФА [16]

Реактивы. 1) 1,2 г иодной кислоты растворяют в 30 мл дистиллированной воды, добавляют 15 мл 0,5 М раствора уксуснокислого натрия и 100 мл этанола. Реактив готовят непосредственно перед использованием.

2) 5,0 г иодистого калия и 5,0 г тиосульфата натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды и добавляют 150 мл 96%-ного этанола и 2,5 мл 2н. соляной кислоты. Этот раствор также готовят непосредственно перед использованием.

3) 1,5 г основного фуксина растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 1,5 г метабисульфита калия и 3 мл концентрированной HCl. Раствор на 12 ч оставляют в холодильнике, затем смешивают его с 3—4 г угольного порошка и фильтруют через плотный бумажный фильтр. Фильтрацию повторяют до почти полного обесцвечивания фильтрата (допускается светло-розовый оттенок). Готовый раствор можно хранить 2—3 дня.

4) 0,4 г метабисульфита калия растворяют в 10 мл дистиллированной воды и добавляют 1 мл концентрированной HCl.

5) К 100 частям 40%-ного раствора формальдегида добавляют 3 части концентрированной HCl.

Методика. Фиксированные электрофореграммы да 10 мин погружают в реактив (1), а затем отмывают в 70%-ном этаноле. Потом их погружают на 8 мин в реактив (2) и снова отмывают в 70%-ном этаноле. Затем 30 мин их окрашивают реактивом (3) и трижды по 5 мин отмывают реактивом (4). После отмывки электрофореграммы на 2 мин погружают в 0,5 н. HCl и на 20 мин помещают в реактив (5). В заключение их отмывают в течение 2 мин в ацетоне и высушивают на воздухе.

ОКРАШИВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИДОВ ПО ЗЮДХОФУ [27]

Реактивы. 1) 1,0 г иодной кислоты растворяют в 30 мл дистиллированной воды и добавляют 70 мл абсолютного этанола.

2) 1,0 г парафуксина растворяют в 30 мл охлажденной 1 н. HCl, при встряхивании добавляют 1 г метабисульфита калия, растворенного в 170 мл дистиллированной воды и оставляют смесь на 48 ч. Затем раствор взбалтывают с порошкообразным углем и фильтруют.

Используемый парафуксин не должен содержать акридина. Не следует применять давно приготовленный метабисульфит калия. При нарушении герметичности упаковки верхний слой реактива нужно отбрасывать.

3) Раствор смеси формальдегида и аммиака. Смешивают равные объемы 1М формальдегида и 1 н. гидроксида аммония.

4) *Дифференцирующие растворы*: а) 96%-ный этанол и б) смесь этанол — 1 н. HCl (5:3).

5) Диэтиловый эфир.

Методика. Электрофореграммы 10 мин обрабатывают реактивом (1), затем 10 мин промывают проточной водопроводной водой и на 2 мин погружают в дистиллированную воду. После этого их окрашивают реактивом (2) до тех пор, пока на бесцветном фоне не появятся красные зоны гликопротеидов. Как только фон электрофореграммы начнет розоветь, полоску следует быстро перенести в реактив (3), в котором она вся приобретет красный цвет. Примерно через 1—3 мин, когда окраска достигнет максимальной интенсивности, электрофореграммы на 5 мин погружают в реактив (4а), а затем в реактив (4б), в котором происходит изменение цвета: гликопротеиды становятся красновато-лиловыми, а фон обесцвечивается. Несколькими сменами реактива (4б) добиваются полного обесцвечивания фона. После этого, чтобы удалить HCl, электрофореграммы вновь промывают реактивом (4а). В заключение их погружают в эфир и высушивают на воздухе.

3. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ ПРИ НИЗКОВОЛЬТНОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ НА БУМАГЕ

Количественная оценка окрашенных белковых фракций, полученных при электрофорезе на бумаге, основывается на том, что для используемых красителей справедлив закон Ламберта — Бэра.

Существует два способа количественного определения красителей, связавшихся с белками: элюирование фракций из электрофореграммы и их колориметрическое измерение и прямая электрофотометрия неразрезанной полоски.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЭЛЮИРОВАНИЯ

ЭЛЮИРОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ

Принцип метода. Вырезают участок бумажной электрофореграммы с каждой отдельной фракцией; сорбированный на этом участке краситель элюируют и определяют колориметрически.

Методика. 1. *Разрезание электрофореграммы на участки, занимаемые отдельными фракциями.* На окрашенных и высушенных электрофореграммах те фракции, которые нужно элюировать, обводят карандашом. В местах, где граница между фракциями видна не четко, т. е. краситель не полностью удален из бумаги, соседние фракции делят по линии наименьшего окрашивания.

После разметки участки электрофореграммы, занимаемые каж-

дой отдельной фракцией, вырезают. Чтобы элюирование было быстрым и достаточно полным, такой участок следует дополнительно разрезать на мелкие кусочки.

2. Элюирование. Соответственно числу фракций готовят ряд пробирок, в которые наливают по 3 мл раствора. Каждый участок электрофореграммы, соответствующий индивидуальной фракции, помещают в отдельную пробирку. Элюирование продолжается 2 ч при комнатной температуре, причем пробирки необходимо периодически встряхивать. При щелочном элюировании полученные элюаты подкисляют 1 мл 0,1 н. HCl и колориметрируют, определяя величину экстинкции при соответствующей длине волны.

В табл. 9 приведен состав элюирующих растворов, а также условия элюирования и колориметрии, рекомендуемые для использования в описанных методах.

Таблица 9

Условия элюирования и колориметрии при разных методах окрашивания электрофореграмм

Краситель	Элюирующий раствор	Время элюирования, ч	Длина волны при колориметрии, м
Амидовый черный	0,1 н. NaOH	0,5	595
Кислый фуксин	0,1 н. NaOH	2	570
Пунцовый красный	0,1 н. NaOH	2	550
Азокармин	0,1 н. NaOH	2	570
Бромфеноловый синий	50%-ный метанол, содержащий 5% Na_2CO_3	0,5	550—600

Когда определяемая фракция содержит значительное количество белка (например, фракция альбумина при электрофорезе белков сыворотки), чтобы получить величины экстинкции, лежащие в пределах максимальной точности показаний прибора, объем элюирующего раствора следует увеличить до 6 мл.

3. Количественная оценка. Если учесть разведение и принять за 100% общую сумму величин экстинкции всех фракций, то можно рассчитать процентное содержание каждой фракции в исследуемом образце.

Примечания. 1. Анализ бумажных электрофореграмм методом элюирования весьма удобен для повседневной работы в клинических лабораториях. Он сравнительно прост, отличается быстротой получения результатов и их хорошей воспроизводимостью.

2. Рекомендуемые красители достаточно быстро окрашивают белковые фракции сыворотки и специфичны в отношении белков, т. е. не окрашивают других компонентов сыворотки. Однако различные белки окрашиваются по-разному. В связи с этим возможны артефакты, для устранения которых некоторые авторы предлагают

вводить в количественный анализ электрофореграмм особые поправки: они должны привести в соответствие данные зонального и свободного электрофореза.

Тем не менее при проведении повседневных клинических анализов и даже в исследовательской работе этими поправками можно пренебречь. Во-первых, расхождение показателей может зависеть не только от самих красителей, но и от различных моментов техники окрашивания, элюирования и т. д. В этом случае внесение поправки только частично исправит ошибку. Во-вторых, техника анализа в руках каждого исследователя со временем стандартизуется настолько, что получаемые результаты становятся сопоставимыми друг с другом, а это вполне удовлетворяет требованиям, предъявляемым к экспериментам в повседневной клинической работе. Если какие-либо особые причины все же заставляют вводить поправки, то их величину следует определить в конкретных условиях, принимая во внимание все особенности опыта. Такие поправки дадут более точные результаты, чем величины, просто заимствованные из литературы.

3. Удобно представлять полученные результаты графически на миллиметровой бумаге. Когда по оси абсцисс откладывают ширину каждой фракции, измеренную на окрашенной электрофореграмме, а по оси ординат наносят процентное содержание белка соответствующей фракции, расположение точек очень напоминает график, получаемый по методу Тизелиуса. Соединив эти точки кривой, мы можем построить таким образом протениограмму сыворотки.

МЕТОД ЭЛЮИРОВАНИЯ РАВНЫХ ОТРЕЗКОВ ВСЕЙ ЭЛЕКТРОФЕРЕГРАММЫ

Окрашенные и высушенные электрофореграммы разрезают поперек на отрезки шириной 1—3 мм, каждый отрезок по отдельности элюируют одним из способов, описанных в этом разделе, и колориметрируют. На графике откладывают по оси ординат величину экстинкции, а по оси абсцисс — положение данного отрезка на электрофореграмме (в мм). В сравнении с предыдущим этот метод дает более правильную кривую. Однако он весьма трудоемок и в конце концов не обеспечивает большей точности. Процентное содержание различных белковых фракций при элюировании равных отрезков электрофореграммы определяют на полученной кривой планиметрически.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип метода: с помощью особой пропитки увеличивают прозрачность бумажной электрофореграммы и в специальном приборе определяют экстинкцию ее последовательно расположенных участков.

ПРИБОРЫ

1. *Вакуумный эксикатор.* Обычный лабораторный эксикатор с краном, соединенный с вакуумным насосом.

2. *Денситометр.* Существует несколько моделей таких приборов, действующих по изложенному ниже принципу (фиг. 4). Бумажную электрофореграмму, прозрачность которой увеличена специальной пропиткой, зажимают между двумя стеклянными пластинками 1 и помещают перед щелью 2, за которой расположен источник света 3. Позади зажатой между стеклянными пластинками электрофореграммы располагается фотоэлемент 4. По силе тока, возникающего в цепи фотоэлемента, можно определить величину экстинкции E для каждого участка электрофореграммы:

$$E = \frac{\text{Световой поток через неокрашенную часть}}{\text{Световой поток через окрашенную часть}}.$$

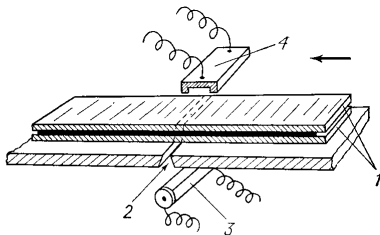
1) *Приборы без автоматических приспособлений.* Приборы для денситометрии, в которых передвижение бумажной электрофореграммы и регистрация экстинкции производятся вручную.

2) *Полуавтоматические приборы.* Денситометры, в которых передвижение электрофореграммы и регистрация экстинкции производятся автоматически. Экспериментатор должен только провести количественный анализ кривой.

3) *Полностью автоматические приборы.* В этих приборах передвижение электрофореграммы, регистрация экстинкции и обсчет полученной кривой производятся автоматически.

МЕТОДИКА

1. *Увеличение прозрачности бумажной электрофореграммы.* Окрашенные и высушенные электрофореграммы погружают в сосуд для окрашивания, заполненный глицерином. Необходимо следить,

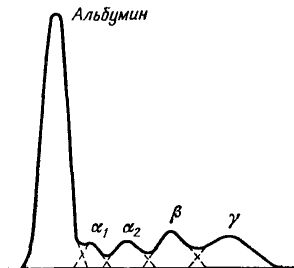


Фиг. 4. Схема прибора для денситометрии бумажных электрофореграмм (описание см. в тексте).

чтобы глицерин полностью покрывал полосы бумаги. Сосуд с погруженными в глицерин электрофореграммами помещают в вакуумный эксикатор, закрывают крышку и на 30 мин создают вакуум, который способствует выходу пузырьков воздуха из бумаги и лучшему пропитыванию последней глицерином. Если через 30 мин окажется,

что глицерин пропитал электрофореграммы недостаточно равномерно, всю процедуру следует повторить.

2. *Денситометрия электрофореграммы и запись протеинограммы.* Пропитанные глицерином бумажные электрофореграммы зажимают между двумя входящими в комплект денситометра стеклянными пластинками толщиной 1 мм. Для точного анализа очень важно, чтобы между пластинками и бумагой не осталось ни одного пузырька воздуха. Пузырьков можно легко избежать, если до закрепления электрофореграммы внутренние поверхности стеклянных пластинок покрыть тонким слоем глицерина. При закреплении электрофореграммы пластинки



Фиг. 5. Количественная оценка электрофоретической диаграммы.

Кривую экстинкции, полученную с помощью фотоэлектрического детектора (сплошная линия), расчленяют на гауссовы кривые (пунктирные линии), соответствующие каждой фракции. Подробное описание см. в тексте.

осторожно двигают относительно друг друга так, чтобы между ними и бумагой не осталось пузырьков воздуха. После этого их тщательно вытирают мягкой тканью и вставляют в соответствующее гнездо денситометра. Реагируя на изменение экстинкции, самописец прибора чертит кривую, весьма похожую на кривую Тизеллиуса.

3. *Количественная оценка протеинограммы.* На протеинограмме каждая фракция представлена отдельной гауссовой кривой (фиг. 5). Площадь под кривой, соответствующей каждой фракции, можно измерить планиметрически или определить путем взвешивания на торзионных весах участка бумаги, вырезанного по ее контуру.

Для взвешивания всегда нужно вырезать полностью всю область, которую очерчивает гауссова кривая данной фракции. Так, например, после взвешивания участка бумаги, соответствующего альбумину, определяя вес участка, соответствующего α_1 -глобулину, к нему следует прибавить участок, являющийся общим для областей этих двух фракций. Суммарный вес всех участков принимают за 100% и, исходя из него, рассчитывают процентное содержание каждой фракции.

При работе с автоматическими приборами обычно пользуются способами расчета, которые рекомендуют фирмы-изготовители.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Для пропитки электрофореграмм вместо глицерина можно применять следующие реактивы: смесь равных частей жидкого парафина и α 1-бромнафталина (показатель преломления 1,5), бензиловый спирт (показатель преломления 1,54), метиловый эфир салициловой кислоты (показатель преломления 1,54).

Наиболее доступным реактивом все же является глицерин. Он особенно удобен для пропитки электрофореграмм, окрашенных для выявления гликопротеидов, но его нельзя применять в том случае, когда электрофореграммы окрашены кислым фуксином, так как он экстрагирует слишком много красителя из бумаги.

Недостаток парафин-бромнафталиновой смеси состоит в том, что при ее использовании бумага сохнет довольно медленно, а сама смесь раздражающе действует на слизистые оболочки.

2. Использование соответствующих светофильтров повышает точность работы денситометра. Следует применять красный светофильтр для денситометрии электрофореграмм, окрашенных синими красителями, и зеленый для электрофореграмм, окрашенных красными красителями. (Соответствующие рекомендации и другие сведения по эксплуатации обычно содержатся в руководстве к прибору.)

3. Величины процентного содержания фракций, определяемые денситометрией электрофореграмм, отличаются хорошей воспроизводимостью. Естественно, они в известной мере расходятся с данными свободного электрофореза или с данными, полученными методом элюирования. Эти расхождения заставляют некоторых исследователей вводить специальные поправки. Наша оценка этих поправок приведена на стр. 61.

4. Увеличение прозрачности электрофореграмм можно получить с помощью приспособления «Элфор-Транспавак» фирмы Вепдер-Нобеин, ФРГ. Приспособление представляет собой стеклянный цилиндрический сосуд, сужением разделенный на две части. В верхнюю часть помещают электрофореграмму, в нижней находится пропитывающая жидкость. Сосуд герметически закрывают притертой крышкой и верхнюю его часть с помощью крана соединяют с вакуумным насосом. Достигнув необходимого разрежения, кран, соединяющий сосуд с вакуумным насосом, закрывают. Сосуд переворачивают, и через несколько минут окрашенная электрофореграмма пропитывается жидкостью. В этом случае не наблюдается образования пузырьков воздуха, которые мешают денситометрии.

4. НЕКОТОРЫЕ ИСТОЧНИКИ ОШИБОК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НИЗКОВОЛЬТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА БУМАГЕ

1. *Плохое разделение, несмотря на длительный электрофорез.* Причину этого явления прежде всего следует искать в недостатках буферного раствора; может быть, слишком высока его концентрация.

2. *Границы отдельных фракций выявляются недостаточно четко.* Причиной этого может быть низкая ионная сила буферного раствора при достаточно высоком напряжении (см. стр. 50) или тепловая денатурация некоторых белков в результате локального выделения тепла при высоком напряжении.

3. *Некоторые белковые фракции остаются в месте нанесения образца.* Причиной этого может быть повреждение бумаги пипеткой в месте нанесения или необратимое связывание части глобулинов с бумагой. Последнее возможно в том случае, если сыворотку наносят на сухую или недостаточно влажную полоску бумаги.

4. *Фракции продолжают диффундировать после выключения тока.* Чтобы избежать этого, следует сразу же после выключения тока извлекать электрофореграммы из электрофоретической камеры.

5. *Повторное разделение одного и того же материала дает разные результаты.* Причина плохой воспроизводимости может заключаться в изменении условий опыта. Чтобы сделать условия опыта стандартными: а) необходимо помнить, что фильтровальная бумага должна быть одного и того же типа; б) необходимо стандартизовать факторы, влияющие на электрофорез (направление потоков буферного раствора, температура и т. п.) (см. стр. 52); в) краситель должен быть одним и тем же; г) не следует менять способа количественной оценки электрофореграмм. При использовании метода элюирования мы советуем окрашивать белки кислым фуксином. Несвязавшаяся с белком часть этого красителя легко удаляется из бумаги, а связавшийся краситель затем легко элюируется. С другой стороны, при фотоэлектрометрии электрофореграмм очень удобно применять окрашивание амидовым черным 10В, так как он прочнее других красителей связывается с белками и примерно в 10 раз сильнее поглощает свет. Несмотря на то что при отмывании электрофореграмм амидовый черный невозможно полностью удалить из бумаги, фотоэлектрические измерения после окрашивания этим красителем достаточно точны.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Принцип метода. Экстинкция белков, содержащих фенилаланин, тирозин и триптофан, при 280 нм прямо пропорциональна их концентрации в растворе. Следует помнить, что коэффициенты экстинкции у разных белков различны.

Методика. Бесцветный, совершенно прозрачный раствор белка помещают в соответствующую кювету спектрофотометра и определяют величину экстинкции при длине волны 280 нм. Концентрацию белка рассчитывают, исходя из известного коэффициента экстинкции.

Примечания. 1. Достоинствами спектрофотометрического определения белка являются простота, скорость и легкость выполнения. При использовании соответствующей аппаратуры (например, прибора «Увикорд» фирмы ЛКВ, Швеция) этот метод позволяет проводить непрерывное определение концентрации белка в растворе.

2. Ограничение этого метода обусловлено тем, что его нельзя с равной эффективностью применять для определения разных белков, так как содержание ароматических аминокислот в них широко варьирует. Кроме того, ряд веществ небелкового происхождения может мешать определению белка (например, нуклеиновые кислоты, окрашенные протестические группы и т. д.).

3. Коэффициент экстинкции разных белков при длине волны 280 нм варьирует от 0,5 до 1,0 см²мг⁻¹.

4. Спектрофотометрическим методом можно определить белок в концентрации не ниже 10—20 мкг/мл.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ ФЕНОЛЬНОГО РЕАКТИВА ФОЛИНА—ЧИОКАЛЬТЕУ [8]

Принцип метода. Фенольный реактив Фолина—Чиокальтеу дает синее окрашивание с щелочными растворами белков. Интенсивность окрашивания в основном зависит от содержания в исследуемом белке тирозина и триптофана.

Чувствительность метода. С помощью макрометода можно определить 100—500, а микрометода — 5—35 мкг белкового азота.

МАКРОМЕТОД

Реактивы. 1. *Фенольный реактив Фолина—Чиокальтеу, приготовление.* В колбе на 2 л в 700 мл дистиллированной воды растворяют 100,0 г Na₂WO₄·H₂O и 25,0 г Na₂MoO₄·H₂O, затем добавляют 50 мл 85 %-ного раствора H₃PO₄ и 100 мл концентрированной HCl. Смесь в течение 10 ч кипятят с обратным холодильником, затем добавляют 150,0 г Li₂SO₄, 50 мл дистиллированной воды и несколько капель брома; еще раз кипятят 15 мин для удаления избытка брома без обратного холодильника. После охлаждения объем реактива доводят до 1000 мл дистиллированной водой и фильтруют в бутыл из темного стекла, так как реактив следует хранить в темноте и оберегать от бактериального прорастания и попадания восстанавливающих веществ.

2. 20 %-ный раствор Na₂CO₃.

Методика. 9 мл исследуемого раствора вносят пипеткой в центрифужную пробирку или коническую колбу на 50 мл и медленно при постоянном помешивании добавляют к нему 5 мл 20%-ного раствора Na_2CO_3 . После этого, осторожно перемешивая, по каплям вливают 1 мл реактива Фолина—Чиокальтеу. Пробу на 5 мин погружают в водяную баню при 37°C , затем на 30 мин оставляют при комнатной температуре и определяют оптическую плотность при 750 нм.

Контрольная проба: к 9 мл дистиллированной воды добавляют 5 мл 20%-ного раствора Na_2CO_3 и 1 мл реактива Фолина.

МИКРОМЕТОД

Реактивы. 1. Раствор А: 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. NaOH .
2. Раствор В: 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе виннокислого натрия.

3. Раствор С: к 60 мл раствора А добавляют 1 мл раствора В; готовят непосредственно перед использованием.

4. Раствор D: реактив Фолина—Чиокальтеу (см. выше). Непосредственно перед применением реактив Фолина—Чиокальтеу титруют раствором NaOH известной нормальности в присутствии фенолфталеина и по данным титрования разбавляют до концентрации 1 н. (обычно примерно вдвое).

Методика. 0,2 мл исследуемого раствора, который может содержать от 5 до 100 мкг белка, смешивают в пробирке с 1 мл раствора С, оставляют на 10 мин и очень быстро в полученную смесь вносят 0,1 мл раствора D, 1—2 с встряхивают, оставляют на 30 мин и спектрофотометрируют при 750 нм. Каждое определение необходимо проводить с параллельными пробами.

Примечания. 1. Интенсивность цветной реакции с разными белками может быть различной, поэтому при постановке как макро-, так и микрометода для каждого исследуемого белка рекомендуется построить калибровочную кривую.

2. Цветная реакция зависит не только от содержания тирозина и триптофана в данном белке, но и от присутствия SH- и других восстанавливающих групп, а также от времени, в течение которого белок содержался в щелочной среде до прибавления реактива Фолина—Чиокальтеу.

3. Определение белка по Фолину—Чиокальтеу проводится довольно быстро и не требует предварительного разрушения исследуемого материала, поэтому оно, несомненно, удобнее определения белка по Кьельдалю. Однако если требуется выразить результаты в единицах белкового азота, то следует построить калибровочную кривую на основе количественного определения белкового азота по Кьельдалю.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИИ [4]

Принцип метода. В щелочных растворах белков 4 атома азота, участвующие в пептидных связях, могут вступить в комплекс с одним атомом меди; эта реакция дает сине-фиолетовое окрашивание.

Чувствительность метода. С помощью биуретовой реакции можно количественно определить от 20 до 400 мкг белкового азота.

Реактивы. Биуретовый реактив в 1 л раствора содержит виннокислый калий-натрий 9,0 г; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3,0 г; KI 5,0 г; 0,2 н. NaOH (свободный от карбонатов).

Виннокислый калий-натрий растворяют в 400 мл 0,2 н. NaOH и прибавляют сульфат меди. Когда компоненты растворятся, добавляют иодистый калий и 0,2 н. NaOH, а затем доводят объем раствора до 1000 мл.

Методика. 1 мл исследуемого раствора белка смешивают с 1,5 мл биуретового реактива, оставляют на 30 мин при 37°C и определяют оптическую плотность при 555 нм.

Контрольная проба. 1 мл дистиллированной воды смешивают с 1,5 мл биуретового реактива. Каждое определение проводится с параллельными пробами.

Примечание. При использовании биуретового реактива в количественной реакции преципитации (см. стр. 125) удобно ставить реакцию в центрифужных пробирках на 8 мл, имеющих отметку 2,5 мл. После отмывки преципитат растворяют в 1,5 мл биуретового реактива и доводят объем раствора до метки (2,5 мл) дистиллированной водой. После инкубации определяют оптическую плотность.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ
НИНГИДРИНОВОЙ РЕАКЦИИ [13]

Принцип метода. Нингидрин дает цветную реакцию с концевыми $\alpha\text{-NH}_2$ -группами белков, а также с $\varepsilon\text{-NH}_2$ -группами остатков лизина.

Чувствительность метода. Метод применим в том случае, когда исследуемый раствор содержит 1—20 мкг белкового азота.

Реактивы. 1. Приготовление 0,2 М цитратного буферного раствора pH 5,0: 2,101 г одноводного кристаллогидрата лимонной кислоты $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ растворяют в 20 мл 1 н. NaOH и добавляют 50 мл дистиллированной воды. После двукратного разведения дистиллированной водой pH буферного раствора должен быть $5,0 \pm 0,1$. Раствор можно хранить в холодильнике, добавив несколько кристалликов тимола.

2. Метилцеллозольв (монометилловый эфир этиленгликоля).

3. Пропанол-водная смесь (смесь равных объемов *n*-пропанола и дистиллированной воды).

4. Нингидриновый реактив. *Приготовление нингидринового реактива:* 40 мг $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 25 мл цитратного буферного раствора и добавляют 4,0 мг нингидрина, предварительно растворенного в 12,5 мл метилцеллозоля. Реактив готовят непосредственно перед опытом.

Методика. 0,1 мл исследуемого раствора белка вносят пипеткой в пробирку на 5 мл со шлифом и прибавляют 0,5 мл нингидринового реактива; закрывают стеклянной пробкой, тщательно перемешивают и 20 мин кипятят на водяной бане. Затем прибавляют 2 мл пропанол-водной смеси, раствор перемешивают, центрифугируют и определяют оптическую плотность надосадочной жидкости при 570 нм.

В контрольной пробе все операции проводят с 0,1 мл дистиллированной воды.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ АМИДОВОГО ЧЕРНОГО [9, 10]

Принцип метода. Амидовый черный связывается белками пропорционально количеству белка.

Чувствительность метода. Метод применим для исследования образцов, содержащих не менее 0,01 мг белка. С его помощью довольно удобно определять концентрацию белков в растворах с малым содержанием белка, например в спинномозговой жидкости, в водянистой влаге глаза и т. д.

Реактивы. 1. *Раствор красителя:* насыщенный раствор амидового черного 10В в охлажденной смеси ледяная уксусная кислота — метанол (1 : 9) (см. стр. 49).

2. *Отмывающий раствор:* смесь ледяная уксусная кислота — метанол (1 : 9).

3. *Растворитель:* 0,1 н. NaOH.

Методика. К 0,2 мл исследуемого раствора белка (в центрифужной пробирке) добавляют 1,0 мл дистиллированной воды, затем пипеткой в пробирку вносят сначала 1, а затем после тщательного перемешивания еще 4 мл красителя. Встряхивают несколько раз и оставляют смесь на 20 мин при комнатной температуре; центрифугируют при 2000 об/мин 10 мин, надосадочную жидкость осторожно сливают или отсасывают пипеткой. Осадок промывают отмывающим раствором до тех пор, пока надосадочная жидкость после очередного центрифугирования не останется бесцветной. Отмытый осадок растворяют в 5 мл растворителя и измеряют оптическую плотность в 1-сантиметровой кювете со светофильтром S-61 при 595 нм против контроля. Величина экстинкции, умноженная на 105, дает величину концентрации белка в мг%.

Б. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА АЦЕТАТ-ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МЕМБРАНЕ [15]

Принцип метода. Белки, нанесенные на смоченную буферным раствором ацетат-целлюлозную мембрану, мигрируют в электрическом поле в соответствии с общим зарядом их молекул.

Область применения этого метода та же, что и электрофореза на бумаге.

ПРИБОРЫ

1. *Камера для электрофореза.* На фиг. 6 схематически представлена камера, которую предложил Кон [15] специально для электрофореза на ацетат-целлюлозной мембране.

2. *Источник тока:* см. стр. 46.

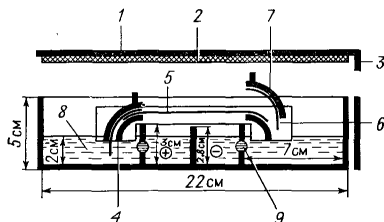
МЕТОДИКА

1. *Приготовление буферного раствора:* см. стр. 47.

2. *Заполнение электрофоретической камеры буферным раствором.* Буферный раствор наливают в камеру до уровня 2 см в высоту.

3. *Увлажнение мембраны.* Держа мембрану двумя пинцетами, медленно и постепенно погружают ее в буферный раствор. Скорость погружения не должна превышать скорости смачивания мембраны. При слишком быстром погружении могут образоваться пузырьки воздуха, мешающие электрофоретическому разделению. После смачивания мембраны избыток буферного раствора удаляют фильтровальной бумагой.

4. *Закрепление мембраны в приборе.* Оба конца влажной мембраны кладут на нижнюю часть специального держателя в камере.



Фиг. 6. Схема камеры Кона [15].

1 — крышка; 2 — слой пенопласта на внутренней стороне крышки; 3 — край крышки; 4 — рамка для растягивания ацетат-целлюлозной мембраны; 5 — ацетат-целлюлозная мембрана; 6 — фитиль из фильтровальной бумаги; 7 — зажим для фильтровальной бумаги; 8 — буферный раствор; 9 — отверстие, соединяющее отсеки с буферным раствором.

Затем между верхней частью держателя и мембраной с обеих сторон помещают полоски фильтровальной бумаги. Опуская верхнюю часть зажима на нижнюю, растягивают и фиксируют мембрану, одновременно прижимая к ней полоски фильтровальной бумаги, которые опускаются в буферный раствор и выполняют роль проводников электрического тока (фиг. 6).

5. *Нанесение исследуемого образца.* Капиллярной пипеткой наносят 5 мкл сыворотки приблизительно в центр растянутой мембраны. Проще всего к центру мембраны приложить линейку и вести вдоль нее кончик пипетки, так чтобы сыворотка впитывалась в мембрану по прямой линии, не доходя 3 мм до краев мембраны. После нанесения камеру закрывают крышкой.

6. *Электрофорез.* Электрофорез продолжается 2 ч при комнатной температуре и градиенте напряжения 10—12 В/см.

7. *Высушивание и окрашивание мембраны.* После окончания электрофореза мембрану извлекают из камеры, пластмассовыми зажимами закрепляют на стеклянной палочке и высушивают сначала при комнатной температуре, а затем при 100°C в течение 5 мин. На последнем этапе белки на мембране фиксируются.

Окрашивать ацетат-целлюлозную мембрану можно так же, как бумажную электрофореграмму (см. стр. 54), либо используя пунцовый S (см. стр. 73).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Описанный микроэлектрофорез на ацетат-целлюлозной мембране позволяет анализировать от 5 до 1000 мкг белка, при этом разделение происходит лучше, чем при электрофорезе на бумаге. Значительными достоинствами этого метода являются быстрота фракционирования и весьма малое количество необходимого для исследования материала.

2. В продаже имеются листы ацетат-целлюлозной мембраны размером 54 × 57 см. Их можно использовать для электрофореза в крупногабаритных приборах.

В макроварианте вырезают полоски мембраны шириной 4 см и увеличивают объем наносимой сыворотки до 0,05—0,06 мл. В этом случае электрофорез продолжается 4—5 ч при напряжении 200 В или 1,5—2 ч при напряжении 400 В. Ионную силу буферного раствора Михаэлиса при этом уменьшают, разбавляя его дистиллированной водой в соотношении 3:2. В остальном макрометод ничем не отличается от микрометода.

3. Электрофорез на ацетат-целлюлозной мембране можно проводить практически в любой камере для горизонтального электрофореза, в которой размещаются полоски длиной свыше 8—10 см. Контакт с буферным раствором может осуществляться непосредственно концами мембраны или полосками фильтровальной бумаги,

выполняющими роль фитилей. Универсальную конструкцию имеет прибор для электрофореза фирмы Schandop (Англия) [15].

4. Широко распространены ацетат-целлюлозные мембраны следующих фирм: Oxoid, Oxo Ltd. (Англия), Millipore Filter Corporation (США), Sartorius Membranfilter Gesellschaft (ФРГ).

ОКРАШИВАНИЕ АЦЕТАТ-ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ

ОКРАШИВАНИЕ ПУНЦОВЫМ S

Окрашивающий раствор: 0,2%-ный раствор пунцового S в 3%-ной трихлоруксусной кислоте.

Отмывающий раствор: 5%-ная уксусная кислота.

Методика. Мембраны на 5—10 мин погружают в окрашивающий раствор, затем ополаскивают в нескольких сменах отмывающего раствора, пока фон не станет совершенно белым. После этого полоски мембраны высушивают между слоями фильтровальной бумаги.

ОКРАШИВАНИЕ НИГРОЗИНОМ

Окрашивающий раствор: 0,002%-ный раствор нигрозина в 2%-ной уксусной кислоте.

Отмывающая среда: водопроводная вода.

Методика. Полоски мембраны, фиксированные нагреванием при 80—100°C или в 5%-ной трихлоруксусной кислоте, погружают в окрашивающий раствор на 1—2 ч. Затем их тщательно отмывают проточной водопроводной водой и высушивают при комнатной температуре.

Примечание. Окрашивание нигрозином весьма удобно для определения очень малых количеств белка.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ЦЕЛЛОГЕЛЕ

Быстрое и четкое фракционирование можно получить на желатинизированной ацетат-целлюлозной мембране, имеющей фирменное название «целлогель» (Chemetron, Италия). Полоски целлогеля поставляются в пластмассовой упаковке в растворе метанола. После извлечения из упаковки их необходимо хранить вплоть до использования в 40—50%-ном растворе метанола. Для электрофореза в целлогеле применяют следующие буферные растворы. А. Буферный раствор с рН 9,0 и $\mu = 0,05 : 5,15$ г диэтилбарбитурата натрия и 2,6 г натриевой соли ЭДТА растворяют в 1 л дистиллированной воды; Б. Буферный раствор с рН 8,6 и $\mu = 0,05 : 10,3$ г диэтилбарбитурата натрия и 1,34 г диэтилбарбитуровой кислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Методика. Полоски целлогеля на 10 мин погружают в буферный раствор и затем избыток раствора удаляют фильтровальной бумагой. Полоски закрепляют в приборе и на опалесцирующую сторону целлогеля наносят 1,5—2,0 мкл сыворотки (другая сторона мембраны целлогеля не адсорбирует белки). При градиенте напряжения 12—15 В/см электрофорез продолжается 1—1,5 ч, после чего полоски извлекают из камеры и окрашивают амидовым черным.

Для приготовления окрашивающего раствора 0,5 г амидового черного растворяют в смеси 50 мл метанола, 40 мл дистиллированной воды и 10 мл уксусной кислоты. Дифференцирование проводят в растворе, состоящем из 500 мл метанола, 450 мл дистиллированной воды и 50 мл уксусной кислоты. Для количественного определения белковых фракций полоску целлогеля разрезают, элюируют каждую фракцию 80%-ным раствором уксусной кислоты или ацетоном и измеряют экстинкцию элюатов при 620 нм. Прозрачные полоски можно денситометрировать без элюирования. Для того чтобы сделать полоски целлогеля прозрачными, их погружают в раствор следующего состава: 50 мл дистиллированной воды, 37 мл метанола, 5 мл уксусной кислоты, 8 мл диацетонового спирта и 1—2 капли глицерина (вместо диацетонового спирта можно прибавить 5 мл молочной кислоты или 6 мл диацетина).

В. ЭЛЕКТРОФРЕЗ В АГАРОВОМ ГЕЛЕ

Принцип метода: см. электрофорез на бумаге. В качестве поддерживающей среды используется агаровый гель.

Область применения: см. электрофорез на бумаге.

ПРИБОРЫ

1. *Источник тока:* см. стр. 46.
2. *Прибор для электрофореза:* см. стр. 46.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление буферного раствора:* см. стр. 47.
2. *Очистка агара:* см. стр. 127.
3. *Приготовление агарового слоя.* Стеклоплатинки тщательно отмывают, высушивают и размещают на строго горизонтальной поверхности (см. стр. 138).

К двум краям стеклянной пластинки прикладывают две смоченные буферным раствором полоски фильтровальной бумаги шириной 40 мм так, чтобы край бумаги шириной 10 мм соприкасался со стеклом, а отрезок бумажной полоски шириной 30 мм выходил за пределы пластинки.

После этого поверхность стеклянной пластинки заливают сверху очень тонким слоем расплавленного агара (1,5%-ный агар в буферном растворе). Этот слой агара должен фиксировать бумажные полоски и предотвратить прилипание к стеклу основного слоя агара, который наносят во вторую очередь.

Как только первый тонкий слой агара затвердеет, на стекло наносят основной поддерживающий слой 1,5%-ного расплавленного агара в вероналовом буферном растворе pH 8,6. Этот слой должен иметь толщину 3—4 мм и покрывать всю поверхность стекла и полоски фильтровальной бумаги. Для этого требуется примерно 250—300 мл расплавленного агара.

После затвердения агара его подравнивают по контуру пластинки и полосок фильтровальной бумаги с помощью лезвия бритвы или острого скальпеля. Для дальнейшей обработки пластинку помещают на специальную подставку, например деревянный брусок или коробочку, имеющую ширину и высоту приблизительно 10 см. После того как пластинку приподнимут, прикрепленные к ней с обеих сторон и покрытые сверху агаром бумажные полоски будут свисать под прямым углом. При закреплении пластинки в электрофоретической камере эти полоски погружаются в буферный раствор. Чтобы обеспечить равную электропроводность во всех участках агарового слоя, необходимо восстановить его целостность в местах перегиба бумажных полосок на краях пластинки. Это делают в последнюю очередь, осторожно заливая пипеткой расплавленный агар в те места, где произошло повреждение слоя.

Прежде чем закрепить пластинку с агаром в электрофоретической камере, в агаровом слое вырезают лунки для внесения исследуемого материала. Обычно эти лунки имеют размер от 3 до 15 мм и располагаются на расстоянии 12—15 мм одна от другой. Их вырезают лезвием, скальпелем или специальным инструментом из стекла или металла, предназначенным для этой цели. Кусочки вырезанного агара удаляют, подцепив их крючком снизу или отсасывая шприцом с большой канюлей.

4. Внесение исследуемого материала. Приготовленную пластинку с агаром закрепляют в электрофоретической камере. Свисающие с ее концов покрытые в верхней части агаром полоски фильтровальной бумаги погружают в буферный раствор.

0,2 мл исследуемой сыворотки разбавляют 0,3 мл дистиллированной воды, подогревают до 40° С и смешивают с 0,5 мл 3%-ного расплавленного агара (приготовленного на дистиллированной воде), охлажденного до 40° С. Нагретой пипеткой эту смесь заливают в лунку, сделанную в агаре. После внесения образцов оставшееся в лунках пространство заполняют 1,5%-ным агаром, приготовленным на буферном растворе. Необходимо следить за тем, чтобы расплавленный агар был полностью свободен от пузырьков воздуха.

5. *Электрофорез.* При градиенте напряжения 6 В/см фракционирование сыворотки крови продолжается 4—5 ч. Во время электрофореза температура агара не поднимается выше 30° С, поэтому специальных приспособлений для охлаждения не требуется.

6. *Фиксация белков.* Как только электрофорез закончился, полоски фильтровальной бумаги, свисающие с концов пластинки, обрезают ножницами, а пластинку с агаром погружают на 1 ч в 2%-ный раствор уксусной кислоты. В результате этой процедуры в агаре можно отчетливо наблюдать зафиксированные белковые фракции.

7. *Высушивание агарового слоя.* После фиксации слой агара сверху накрывают фильтровальной бумагой, смоченной в дистиллированной воде. Бумагу следует разгладить на поверхности агара, чтобы между ней и агаром не было пузырьков воздуха. Затем агаровый слой оставляют на ночь при 37° С для подсушивания. После высушивания бумагу удаляют и агаровый слой окрашивают одним из предлагаемых методов.

МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ АГАРОВЫХ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ

ОКРАШИВАНИЕ БЕЛКОВ АМИДОВЫМ ЧЕРНЫМ 10В

Окрашивающий раствор: 1,0 г амидового черного растворяют в 900 мл ацетатного буферного раствора. Ацетатный буферный раствор готовят смешиванием 500 мл 1 М уксусной кислоты (60 г/л), 500 мл 0,1 М $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (13,6 г/л) и 100 мл глицерина.

Отмывающий раствор: смешивают 830 мл дистиллированной воды, 20 мл уксусной кислоты и 150 мл глицерина. После окрашивания в течение 5 ч агаровые пластинки отмывают, меняя каждые 20 мин отмывающий раствор, пока не содержащие белка участки агара не освободятся от красителя.

Во время окрашивания слой агара отклеивается от стекла. После того как отделившиеся агаровые пластинки окрасятся, их помещают на стекло и высушивают при комнатной температуре.

ОКРАШИВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ СУДАНОМ ЧЕРНЫМ

Окрашивающий раствор: 1,2 г судана черного растворяют в смеси, содержащей 400 мл абсолютного спирта, 380 мл дистиллированной воды и 20 мл 25%-ного раствора NaOH. Раствор доводят до кипения и охлаждают.

Отмывающий раствор: 50%-ный этанол. После окрашивания в течение 2 ч агаровые пластинки отмывают, дважды погружая на 15 мин в отмывающий раствор. Если окрашенный препарат поме-

стить на 5 ч в 15%-ный водный раствор глицерина, происходит отделение агаровой пластинки от стекла.

Количественное определение белков при электрофорезе в агаре. Процентное содержание полученных фракций можно определить фотоэлектрическим методом. Отделенная от стекла и высушенная агаровая пластинка достаточно прозрачна, поэтому ее без дополнительной обработки помещают между стеклянными пластинками денситометра и проводят измерение оптической плотности, как описано на стр. 63.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Миграция белков в слое агарового геля подобна их движению при свободном электрофорезе. Однако в агаровом геле значительно сильнее, чем при электрофорезе на бумаге, выражен электроосмос, который усиливает поток буферного раствора в сторону катода. Чтобы устранить возможные артефакты, следует размещать лунки для внесения исследуемого образца точно в центре агаровой пластинки.

2. В электрофоретических камерах типа Грассмана—Ханнига можно использовать стеклянные пластинки размером 16×4 см. Приготовление агарового слоя на этих пластинках производится так же, как описано выше.

3. Вместо того чтобы вносить белковый раствор (например, сыворотку крови) в заранее вырезанную лунку, можно нанести его на отрезок фильтровальной бумаги 10×3 мм и приложить бумагу к поверхности агара в соответствующем месте, после чего белковый раствор диффундирует в гель. Преимущество этого способа заключается в том, что отпадает необходимость вырезать нарушающие целостность электрофореграммы лунки. Но, с другой стороны, при этом способе внесения образца нельзя точно определить количество белка, продиффундировавшего в агар.

4. Во время электрофореза можно непосредственно наблюдать за миграцией белков сыворотки, если окрасить их конго красным или бромфеноловым синим. Эти красители движутся вместе с фракцией альбумина.

5. Кроме описанного фиксатора, при окрашивании липопroteinов можно применять также фиксирующий раствор следующего состава [29]: смесь 500 мл этанола, 20 мл 10%-ного раствора CaCl_2 и 20 мл уксусной кислоты, объем которой доводят до 1000 мл дистиллированной водой. Агаровые пластинки помещают в этот фиксатор на 6 ч.

Г. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В КРАХМАЛЬНОМ ГЕЛЕ

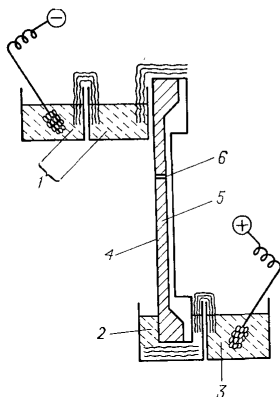
1. ВЕРТИКАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В КРАХМАЛЬНОМ ГЕЛЕ

Принцип метода. Под влиянием электрического поля происходит миграция белков в крахмальном геле.

Область применения. Изучение белков сыворотки, липо- и гликопротеидов, белковых гормонов, гемоглобинов, тканевых белков и т. д.

ПРИБОРЫ

1. *Прибор для электрофореза*, предложенный Смитисом в 1955 г. [26]. На фиг. 7 представлена схема прибора для вертикального электрофореза в крахмальном



Фиг. 7. Прибор для электрофореза в крахмальном геле (по Смитису [26]).

1, 2, 3 — резервуары для буферного раствора; 4 — пластмассовая ванна; 5 — крахмальный гель; 6 — место нанесения образца.

полнения камер прибора используют буферный раствор, содержащий 0,3 М H_3BO_3 и 0,06 н. NaOH.

2. *Приготовление крахмального геля.* Навеску картофельного крахмала суспендируют в 3 объемах воды, тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин для отстаивания. Надосаочную жидкость,

геле, имеет размер $6,5 \times 20 \times 250$ мм. Буферный раствор заливают в резервуары 1 и 2, разделенные перегородкой из плексигласа на два отсека. В наружном отсеке каждого резервуара находятся угольные или платиновые электроды. Оба отсека в каждом резервуаре, а также буферный раствор и крахмальный гель соединяются между собой влажными полосками фильтровальной бумаги.

2. *Источник тока:* см. стр. 46.

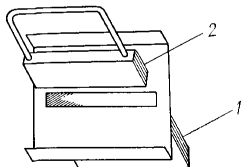
МЕТОДИКА

1. *Приготовление буферного раствора.* Для крахмального геля готовят боратный буферный раствор 0,03 М H_3BO_3 в 0,012 н. NaOH, а для за-

в которую переходят из крахмала растворимые примеси, отбрасывают. Отмывание крахмала отстаиванием повторяют дважды, затем осадок переносят в воронку Бюхнера и 3—4 раза промывают буферным раствором. После этого делают пастоподобную смесь крахмала с буферным раствором и примерно 100 мл этой пасты переносят в коническую колбу емкостью 0,5 л. Постоянно размешивая, крахмальную пасту нагревают до получения абсолютно гомогенной массы, причем следует избегать кипения геля. Чтобы удалить пузырьки воздуха, в колбе, содержащей нагретый гомогенный крахмальный гель, с помощью вакуумного насоса создают разрежение, и гель на 1—2 мин вскипает. После этого им заполняют ванну прибора для электрофореза; избыток буферного раствора удаляют с помощью толстой фильтровальной бумаги, а для того чтобы предотвратить испарение, поверхность геля заливают тонким слоем расплавленного парафина.

3. *Соединение внутренней электрической цепи прибора.* Крахмальный гель в вертикально расположенной ванне и буферный раствор, заполняющий резервуары 1 и 2, а также буферный и электродный отсеки в каждом резервуаре соединяются между собой бумажными мостиками. Каждый мостик состоит из 10 полосок фильтровальной бумаги, смоченной буферным раствором.

4. *Внесение исследуемого образца.* На расстоянии 7 см от катодного конца крахмального блока отмечают место внесения образца и в парафиновой пленке прорезают окошко размером 10×3 мм. Затем удаляют лежащий под парафином слой крахмального геля так, чтобы получился желобок, в который и вносится исследуемый материал. Очень удобно можно сделать этот желобок с помощью приспособления, изображенного на фиг. 8. Оно представляет собой стальную рамку с острыми краями 1, которую, надавливая, погружают в крахмальный гель; попадающий при этом в ее внутреннюю полость кусочек геля удаляют. 0,05 мл сыворотки тщательно размешивают с сухим крахмалом, который берут в таком количестве, чтобы получилась однородная паста такой же консистенции, как и сам гель. При помощи «плунжерной» части 2 приспособления эту пасту вносят в желобок. Удалять рамку следует очень осторожно, стараясь не повредить целостность геля. После этого окошко в парафиновой пленке закрывают новым слоем расплавленного парафина.



Фиг. 8. Приспособление, с помощью которого делают желобок для внесения образца в крахмальный блок (описание см. в тексте).

5. *Электрофорез.* Электрофорез в крахмальном геле продолжается 14—18 ч при градиенте напряжения 6 В/см.

6. *Локализация белковых фракций.* Закончив электрофорез, ванну с крахмальным гелем извлекают из прибора и располагают горизонтально на столе. Пленку парафина, закрывающую гель, удаляют, и всю поверхность крахмала покрывают листом фильтровальной бумаги. Лист плотно прижимают к поверхности геля в течение 5 мин, затем снимают его, высушивают в сушильном шкафу при 100° С и окрашивают белковыми красителями (см. стр. 54). Этим способом удается установить локализацию фракций, не прибегая к окрашиванию самого крахмального геля (метод отпечатков).

7. *Элюирование белковых фракций.* Используя окрашенный булавочный отпечаток, отмечают границы каждой фракции на крахмальном блоке. Острым лезвием по этим границам делят гель на фрагменты. Каждый фрагмент крахмального геля отдельно суспендируют в 10 мл холодной дистиллированной воды, частицы крахмала осаждают центрифугированием при 2000 об/мин и в надосадочной жидкости определяют содержание белка.

2. ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В КРАХМАЛЬНОМ ГЕЛЕ

В нашей лаборатории горизонтальный электрофорез в крахмальном геле проводят по методу Смитиса [26] в камере для зонального полумикроэлектрофореза следующим образом.

Буферный раствор: боратный буфер pH 8,6. *Приготовление буферного раствора, заполняющего камеры прибора:* 45,65 г H_3BO_3 и 7,2 г NaOH растворяют в дистиллированной воде в конечном объеме 5 л. *Приготовление буферного раствора для крахмального геля. Основной раствор:* 30,92 г H_3BO_3 и 8,0 г NaOH растворяют в дистиллированной воде и доводят конечный объем до 1 л. Перед приготовлением крахмального геля 60 мл основного раствора разводят дистиллированной водой до 1000 мл.

МЕТОДИКА

Приготовление крахмального геля. Берут такую навеску гидролизованного картофельного крахмала, чтобы конечная его концентрация составляла примерно 13—14%. Взвешенный крахмал суспендируют с размешиванием в 1/4 конечного объема буферного раствора. Остальной объем буферного раствора нагревают до кипения и затем охлаждают до тех пор (примерно до 96° С), пока не исчезнут пузырьки пара и воздуха. В горячий буферный раствор вливают суспензию крахмала и осторожно перемешивают, избегая образования пузырьков. Легче всего избавиться от пузырьков воздуха, поместив крахмальную суспензию в вакуум. Появление

стекловидной прозрачности геля свидетельствует о том, что размещиванием достигнута определенная степень гомогенности.

Полученный гель выливают в горизонтальную ванну, прикрытую стеклянной пластинкой. Эта ванна входит в комплект прибора для электрофореза. Гель должен полностью покрывать обеспечивающие электрический контакт фитили. Подготовку ванны с крахмальным гелем необходимо закончить в течение 3—5 мин. Примерно через час после этого в гель можно вносить исследуемый образец, как это описано в п. 4 разд. 1.

Электрофорез продолжается 6 ч при 140 В и 70 мА. Закончив электрофорез, крахмальный блок горизонтально разрезают на две половины, одну из которых окрашивают амидовым черным 10 В (см. стр. 87).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Гидролиз картофельного крахмала. 500,0 г имеющегося в продаже картофельного крахмала гидролизуют в смеси HCl и ацетона (10 мл химически чистой HCl и 990 мл ацетона) при 37° С в течение 6—18 ч. Для прекращения гидролиза добавляют, тщательно перемешивая, 250 мл 1 М раствора уксуснокислого натрия (134,0 г на 1000 мл).

Гидролизованный крахмал отмывают обычно на воронке Бюхнера 5 л дистиллированной воды, пропускают через него под вакуумом 300—350 мл ацетона для подсушивания и окончательно высушивают под инфракрасной лампой 3—4 ч, не допуская перегрева выше 60° С. После высушивания крахмал на 24 ч оставляют на воздухе.

2. Если для приготовления геля использовать частицы крахмала определенного размера, то электрофорез в таком геле может дать лучшее разделение белков, чем на бумаге.

3. Описанные выше методы электрофореза в крахмальном геле позволяют одновременно анализировать несколько белковых растворов (например, сразу несколько сывороток), если использовать более широкую ванну для геля. Например, в ванне шириной 124 мм можно одновременно параллельно фракционировать 8—10 сывороток.

4. Кроме описанного, существует также другой простой способ внесения исследуемого образца в гель. Необходимое количество белкового раствора наносят на полоску фильтровальной бумаги и погружают эту полоску в узкую щель, вырезанную скальпелем или шпателем в крахмальном блоке. Затем гель осторожно уплотняют вокруг полоски, чтобы обеспечить более тесный контакт ее с крахмалом.

5. Локализация фракций с помощью окрашивания. Можно определить положение белковых фракций в крахмале, окрашивая непосредственно сам гель, например амидовым черным 10 В.

Приготовление окрашивающего раствора: 2,0 г амидового черного 10 В растворяют в 500 мл метанола и оставляют на 24 ч, затем добавляют 100 мл уксусной кислоты и 400 мл дистиллированной воды. Через 24 ч раствор красителя готов для использования.

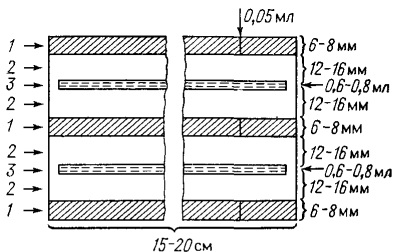
Дифференцирующий раствор: смешивают 500 мл метанола, 100 мл уксусной кислоты и 400 мл дистиллированной воды. Окрашивают 20 мин, дифференцируют дважды по 20 мин.

6. Толщина слоя крахмального геля не должна превышать 5—10 мм. В более толстом слое геля миграция белков происходит неравномерно.

7. Фракции белка, разделившиеся в крахмальном геле, можно идентифицировать в реакции преципитации со специфической антисывороткой. Для этого Шёрлен и Голь [25] предложили комбинировать электрофорез в крахмальном геле с иммунодиффузией в агаровом геле.

Методика. Закончив электрофорез, крахмальный блок горизонтально разрезают на две половины. Одну половину окрашивают обычным образом, другую переносят на стеклянную пластинку и располагают колонки крахмала так, как показано на фиг. 9. Затем вокруг них наливают горячий раствор агара (приготовление см. на стр. 127), при застывании которого образуется слой толщиной 3 мм. Агар не должен закрывать крахмальный гель; на расстоянии 12—16 мм от колонок крахмала в нем делают прорезы шириной 1 мм (фиг. 9). Через 6—12 ч после нанесения на пластинку агара в эти прорезы заливают специфическую антисыворотку к фракционируемым белкам. В результате диффузии белков и антигенов в агаре через 2—4 дня появляются линии преципитации (см. иммуноэлектрофорез, стр. 137).

8. Электрофорез в крахмальном геле, содержащем мочевины. Эффективность разработанного Пуликом и Эдельманом [22] метода



Фиг. 9. Комбинация электрофореза в крахмальном геле с иммунодиффузией в агаре [25].

1 — крахмальный гель; 2 — агаровый гель; 3 — иммунная сыворотка.

анализа Н- и L-цепей иммуноглобулинов с помощью электрофореза в крахмальном геле, содержащем мочевины, была подтверждена в нашей лаборатории.

Буферный раствор для приготовления геля: 240,0 г мочевины и 1,35 г муравьиной кислоты растворяют в дистиллированной воде в конечном объеме 500 мл.

Буферный раствор для заполнения камер прибора: 9,6 г NaOH и 32,7 г муравьиной кислоты растворяют в дистиллированной воде в конечном объеме 3 л.

Крахмал суспендируют в 270 мл буферного раствора, предназначенного для геля, в котором растворено 40,0 г мочевины. Все остальные процедуры проводят так же, как и при обычном горизонтальном электрофорезе в крахмальном геле (стр. 80).

9. Препаративный электрофорез в крахмальном блоке. Принцип метода. Под влиянием электрического поля происходит миграция белков в крахмальном блоке, в результате которой белки разделяются, а после разделения их можно элюировать из крахмала.

Область применения: препаративное выделение индивидуальных белков из белковых смесей, очистка белковых фракций.

Приборы. 1. *Источник тока.* Для этого метода необходим источник постоянного тока со стабилизированным напряжением от 0 до 500 В.

2. *Аппарат для электрофореза в крахмальном блоке.* В продаже имеется ряд специальных аппаратов для электрофореза в крахмальном блоке. Вместе с тем некоторые изменения конструкции позволяют приспособить для этой цели почти любой лабораторный прибор для электрофореза. Аппарат для электрофореза в крахмальном блоке имеет: а) резервуары для буферного раствора и электродов (см. стр. 46), б) ванну для крахмального блока, которую можно сделать самостоятельно следующим образом. Вырезают две одинаковые пластинки из плексигласа (например, размером $50 \times 13 \times 0,5$ см). По кромке одной из них наклеивают плексигласовый бортик высотой 0,5 см. Вторая пластинка служит крышкой для этой ванны. По краям пластинок на расстоянии примерно 10 см одно от другого высверливают отверстия для того, чтобы крышку и ванну можно было скрепить винтами.

Методика. 1. *Приготовление крахмального геля.* В колбе на 1 л смешивают примерно 300 мл вероналового буферного раствора рН 8,6 (см. стр. 47) с равным объемом очищенного (не гидролизованного!) картофельного крахмала. Размешав, густую пасту выливают на плексигласовую пластинку с бортиком и оставляют на 10 мин. Фильтровальной бумагой удаляют избыток буферного раствора и затем поверхность крахмальной пасты разглаживают лопаточкой или другим подходящим инструментом. На одном конце готового блока вырезают желобок размером 1×9 см и в него вносят исследуемый раствор белков (например, 3 мл сыворотки крови), пред-

варительно смешанный с сухим крахмалом до консистенции густой пасты. Из фильтрованной бумаги соответствующего размера делают фитили и, смочив их буферным раствором, накладывают на оба конца крахмального блока так, чтобы они обеспечили контакт в электрической цепи с буферными растворами в резервуарах аппарата. Ванну с крахмальным гелем закрывают крышкой, которую закрепляют винтами.

2. *Электрофорез.* Смоченные фитили обеспечивают контакт в электрической цепи крахмального блока с буферным раствором в резервуарах аппарата. Систему на 15 мин оставляют для уравнивания и затем проводят электрофорез при напряжении 300 В и силе тока 30 мА в течение 24—30 ч, желательно с охлаждением.

3. *Выделение фракций.* Закончив электрофорез, блок извлекают из ванны и, слегка подсушив, разрезают на фрагменты шириной 1 см. Каждый фрагмент переносят в центрифужную пробирку соответствующего размера и размешивают с 3 мл буферного раствора. Осадок крахмала отделяют центрифугированием, а в надосадочной жидкости определяют содержание белка и на основании этих данных строят кривую фракционирования. В соответствии с этой кривой нужные фракции объединяют.

Примечания. 1. В зависимости от конкретных условий размеры крахмального блока могут варьировать. Однако следует помнить, что при толщине геля, значительно превышающей 0,5 см, начинает проявляться действие силы тяжести; при этом буферный раствор может скапливаться в нижних слоях крахмального блока, что ухудшает разделение.

2. Перед заполнением ванны крахмалом ее рекомендуется выстлать жиронепроницаемой бумагой, пленкой «парафильм» или нейлоном; этими же материалами следует покрыть блок, прежде чем закрывать крышку ванны.

3. Для непрерывного наблюдения за миграцией белков при фракционировании сыворотки к ней рекомендуется добавить бромфеноловый синий.

4. Вместо крахмала весьма удобно использовать певикон, который следует обрабатывать так же, как и крахмал.

Д. ЭЛЕКТРОФЕРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

1. ЗОНАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ [20, 21]

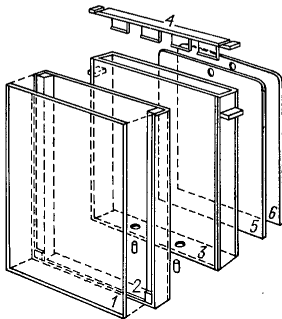
Принцип метода. Под влиянием электрического поля происходит миграция белков в геле, образованном при сополимеризации акриламида и N, N'-метиленбисакриламида.

Область применения: электрофоретическое фракционирование белков. Зональный электрофорез в полиакриламидном геле является

ся наилучшим методом электрофоретического фракционирования белковых смесей. Он позволяет разделить белки сыворотки человека примерно на 20 отчетливо различаемых фракций.

ПРИБОРЫ

1. *Приспособление для приготовления геля.* Гель готовят в простом приборе, который можно сделать в любой подсобной мастерской. Модель, изображенная на фиг. 10, изготавливается фирмой Sartorius Membranfilter Ltd. (ФРГ). Образование геля происходит в прямоугольной камере 3, в которую вставляется сосуд 2, с крышкой 1. Два отверстия, сделанные в дне камеры, могут плотно закрываться резиновыми пробками. Прокладки 5 и 6 изготовлены из плексигласа, и их длина несколько превышает высоту сосуда. Закрытый крышкой сосуд вместе с прокладками вставляют в камеру. Затем сосуд до краев наполняют гелеобразующей жидкостью и осторожно закрывают крышкой 4, избегая образования пузырьков воздуха. Прокладки, а также отверстия в нижней части камеры значительно облегчают извлечение сосуда из камеры после окончания гелеобразования.

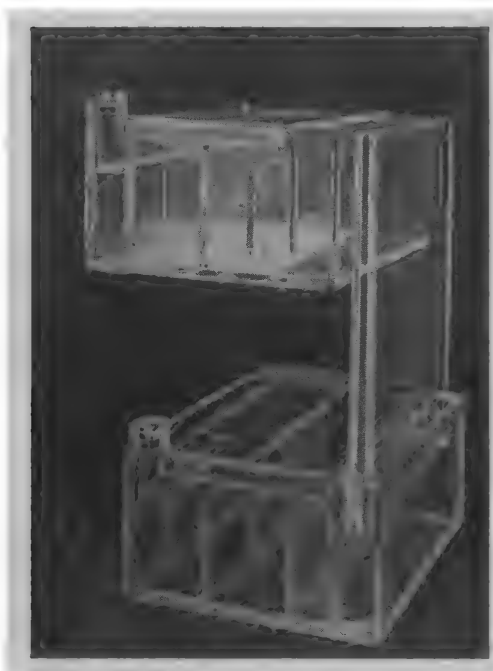


Фиг. 10. Прибор для приготовления полиакриламидного геля (описание см. в тексте).

2. *Резервуары для буферного раствора* (фиг. 11). Резервуары для буферного раствора закрепляются на штативе, который не показан на фиг. 11. Сосуд 2, наполненный гелем, располагается вертикально, так что нижняя не закрытая крышкой 1 часть геля (см. фиг. 10) контактирует с буферным раствором, в то время как контакт верхнего конца пластинки геля с буферным раствором верхнего резервуара обеспечивается с помощью фитилей из фильтровальной бумаги.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление буферного раствора pH 8,6, $\mu = 0,3$.* Основной раствор: 17,94 г диэтилбарбитурата натрия растворяют в 129 мл 0,1 н. HCl и прибавляют 871 мл дистиллированной воды. Буферный раствор: основной раствор разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1 : 2.



Фиг. 11. Резервуары для буферного раствора и контейнер с гелем прибора для электрофореза в полиакриламидном геле (описание см. в тексте).

Гель. а) 2,5 г N, N'-метиленабисакриламида растворяют в 400 мл буферного раствора при осторожном нагревании в водяной бане, после чего объем раствора доводят тем же буферным раствором до 500 мл (конечная концентрация N,N'-метиленабисакриламида должна быть 0,5%); б) 17,5 г акриламида растворяют в 133,6 мл раствора (а), буферным раствором доводят объем до 350 мл и фильтруют. Полученный раствор остается жидким до тех пор, пока в него не добавят катализатор. Катализатор следует добавлять непосредственно перед заполнением сосуда, в котором происходит гелеобразование. В качестве катализатора гелеобразования можно

применять раствор персульфата аммония (приготовленный раствор годен к применению не более недели) или раствор диметиламинопропионитрила.

После добавления катализатора гелеобразующий раствор следует тщательно перемешать и заполнить им сосуд.

Образование геля происходит примерно через 20—30 мин.

2. *Заполнение камеры и образование геля.* Закрытый крышкой 1 сосуд 2 вместе с прокладками 5 и 6 вдвигают в камеру 3; отверстия в нижней части камеры плотно закрывают резиновыми пробками. Сосуд 2 до краев заливают гелеобразующим раствором и закрывают крышкой 4.

3. *Подготовка прибора для электрофореза.* Как только произойдет образование геля, резиновые пробки в нижней части камеры 3 вынимают, осторожно выдвигают прокладки 5 и 6 и, наконец, извлекают сосуд 2, содержащий гель. Его монтируют вертикально таким образом, чтобы наполняющий нижний резервуар прибора буферный раствор мог свободно контактировать с поверхностью геля. С помощью соответствующего штатива закрепляют верхний резервуар прибора и соединяют его с верхней частью сосуда 2. Крышку 4 осторожно приподнимают. Благодаря выступам на ее внутренней поверхности (см. фиг. 10) в верхнем слое геля образуются углубления правильной формы, которые могут служить лунками для внесения образца. Избегая образования пузырьков воздуха, эти углубления заполняют буферным раствором с помощью капиллярной пипетки. Электрический контакт между буферным раствором, содержащимся в верхнем резервуаре, и верхним концом столбика геля осуществляется за счет полоски фильтровальной бумаги соответствующей формы, смоченной буферным раствором. Исследуемую сыворотку (или любую другую смесь белков) вносят в заполненные буферным раствором углубления верхней части геля, причем 0,03 мл сыворотки подслаивают на дно углубления, и она оказывается между гелем и буферным раствором, покрывающим гель до начала электрофореза.

4. *Электрофорез.* При толщине блока полиакриламидного геля 6 мм электрофорез продолжается 36 ч при напряжении 100 В и силе тока 25—30 мА. За это время белки успевают мигрировать на расстояние до 23 см. После окончания электрофореза сосуд, содержащий гель, вынимают из прибора, осторожно снимают крышку и, стараясь не повредить гель, переносят его в окрашивающий раствор.

5. *Окрашивание полиакриламидного геля. Окрашивающий раствор:* 1,0 г амидового черного 10В растворяют в 200 мл смеси уксусная кислота—метанол—дистиллированная вода (1 : 5 : 5), оставляют на ночь и затем фильтруют. Окрашивающий раствор можно использовать несколько раз, но предварительно его каждый раз необходимо фильтровать. *Дифференцирующие растворы:* 1) раствор, содержа-

ший смесь уксусная кислота—метанол—дистиллированная вода (1 : 5 : 5) и 2) 7%-ный раствор уксусной кислоты.

После 30 мин окрашивания гель несколько минут промывают водопроводной водой, помещают сначала на 24 ч в первый дифференцирующий раствор, а затем во второй до полного обесцвечивания тех частей, которые не содержат белка.

6. *Количественная оценка.* Количественный анализ пластинок геля проводят с помощью денситометра (см. стр. 63).

Примечания. 1. 7,5%-ный полиакриламидный гель имеет поры со средним размером около 50 Å. Белки, диаметр молекул которых не превышает 40 Å, должны мигрировать в нем без задержки.

2. Удаление красителя из геля можно производить электрофоретическим способом.

3. При денситометрии пластинок геля толщиной 6 мм могут возникнуть затруднения, для устранения которых приходится вносить изменения в устройство денситометра.

2. ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Принцип метода. Миграция и разделение белков происходят в небольших цилиндрических колонках полиакриламида. [Термин *диск-электрофорез* происходит от дископодобной формы фрагментов колонки геля, в которых содержатся фракции, а также от английского слова «discontinuous», которым названа неоднородная («прерывистая») буферная система, обычно используемая в этом методе.]

Область применения: фракционирование и определение гомогенности белков (сывороточных белков, ферментов, белковых гормонов и т. д.), нуклеиновых кислот, пептидов и т. д.

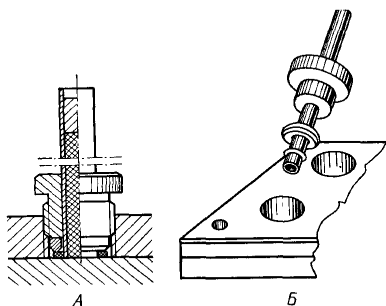
ПРИБОРЫ

В продаже имеются приборы нескольких типов. Ниже мы описываем прибор для аналитического электрофореза в полиакриламидном геле, который производит фирма Reanal (Венгрия).

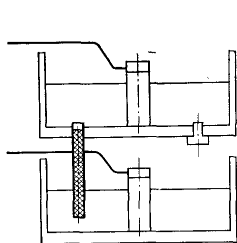
1. *Стеклянные трубки для геля и подставка для них.* Колонки геля готовят в стеклянных трубках, имеющих длину 100 мм и внутренний диаметр 6 мм. На время полимеризации геля их вставляют в специальную подставку, представляющую собой двухслойную плексигласовую пластинку, в верхнем слое которой высверлены отверстия для трубок (фиг. 12, А). Трубки устанавливают вертикально и закрепляют внизу завинчивающимися плексигласовыми кольцами и резиновыми прокладками (фиг. 12, Б).

2. *Прибор для электрофореза.* Прибор состоит из верхнего и нижнего резервуаров для буферного раствора (фиг. 13), изготовленных из плексигласа. Верхний резервуар крепится на нижнем

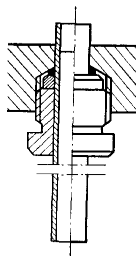
плексигласовыми стойками с винтами. В центре каждого резервуара в цилиндрическом патроне из плексигласа помещается угольный электрод, который вместе с патроном можно извлечь из резервуара. В стенке патрона сделаны отверстия для постоянного кон-



Фиг. 12. Подставка для заполнения стеклянных трубок гелем, входящая в комплект прибора для аналитического диск-электрофореза (описание см. в тексте).



Фиг. 13. Буферные резервуары прибора для аналитического диск-электрофореза.



Фиг. 14. Крепление стеклянной трубки с гелем ко дну буферного резервуара.

такта электродов с буферным раствором независимо от его уровня, поскольку эти отверстия образуют лабиринтную систему. Снизу ко дну верхнего резервуара крепятся 12 стеклянных трубок, заполненных гелем. Они размещаются на равном расстоянии от электрода

по кругу с диаметром 100 мм. Таким образом прибор позволяет исследовать одновременно 12 образцов. Трубки крепятся ко дну буферного резервуара с помощью завинчивающихся колец (фиг. 14).

МЕТОДИКА

1. *Приготовление растворов.* а) *Основные растворы для приготовления геля.* Раствор $A_{\text{щ}}$: 36,6 г триса (чистого) растворяют в дистиллированной воде, добавляют 48 мл 1 н. HCl (х. ч.), 0,23 мл N, N, N', N' -тетраметилэтилендиамина (ч.) и дистиллированной водой доводят объем до 100 мл.

Раствор $B_{\text{щ}}$: 0,735 г N, N' -метиленбисакриламида растворяют в дистиллированной воде, затем добавляют 28,0 г акриламида, доводят объем дистиллированной водой до 100 мл и фильтруют.

Раствор $B_{\text{ц}}$: 0,14 г персульфата аммония (х. ч.) растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл.

Растворы $A_{\text{щ}}$ и $B_{\text{щ}}$ можно хранить несколько недель в склянках из темного стекла в холодильнике. Срок использования раствора $B_{\text{щ}}$ — не более недели.

б) *Раствор мономеров для приготовления мелкопористого геля (рН 8,9).* Смешивают растворы $A_{\text{щ}}$, $B_{\text{щ}}$, $B_{\text{ц}}$ и дистиллированную воду в соотношении 1 : 2 : 4 : 1. Если готовят гель для заполнения всех 12 трубок, то каждая часть соответствует 3,5 мл.

в) *Электродный буферный раствор (рН 8,3).* В дистиллированной воде растворяют 1,2 г триса (х. ч.), 5,76 г глицина (х. ч.) и доводят объем до 200 мл.

г) *Раствор амидового черного.* 10,0 г амидового черного 10 В растворяют в 7%-ной уксусной кислоте в конечном объеме 1000 мл. Перед использованием раствор красителя следует профильтровать через бумагу. Для отмывки и хранения колонок полиакриламидного геля можно использовать 7%-ный раствор уксусной кислоты.

2. *Приготовление геля.* Стеклообразные трубки закрепляют в подставке. В вакуумной колбе на 50 мл готовят раствор мономеров (б) и удаляют из него воздух, создавая разрежение в колбе с помощью вакуумного насоса. В каждую стеклянную трубку пипеткой вносят по 2 мл раствора мономеров и, чтобы не образовывался мениск, сверху наслаивают 5—8 мм разбавленного в 8 раз раствора $A_{\text{щ}}$. Полимеризация наступает примерно через 30 мин. Как только она произойдет, между гелем и расположенной выше жидкостью образуется четкая граница. После образования геля слой жидкости удаляют фильтровальной бумагой.

3. *Внесение исследуемого образца.* Исследуемые растворы, содержащие примерно 1—2 мг белка в 1 мл, разбавляют равным объемом 40%-ной сахарозы. На каждую колонку полиакриламидного геля наносят 50—100 мкг гомогенного или 200—500 мкг гетерогенного белка или смеси белков. После внесения образца трубки осто-

рожно заполняют электродным буферным раствором. Заполненные трубки монтируют ко дну верхнего резервуара и в каждый резервуар заливают по 1 л соответствующего буферного раствора.

4. *Электрофорез.* В первые 30 мин электрофореза ток в цепи должен достичь 2 мА и позже не должен превышать 5 мА. Рекомендуется поместить работающий прибор в холодильник. Разделение белков сыворотки продолжается примерно 60—90 мин.

5. *Извлечение геля из стеклянных трубок.* По окончании электрофореза трубки вынимают из прибора и погружают в кювету, наполненную водой. Под водой между гелем и стеклом спиральным движением вводят узкую лопаточку или упругую проволочку, отслаивая гель от поверхности стекла. Вода проникает между гелем и стеклом, и колонка геля легко извлекается из трубки.

6. *Окрашивание.* Колонки геля на 1 ч погружают в раствор амидового черного, затем ополаскивают водопроводной водой и переносят в отмывающий раствор. Смену отмывающего раствора производят до полной прозрачности участков геля, не содержащих белка.

Примечания. 1. Основные белки и пептиды анализируют в кислой среде (рН 4,3). Для их фракционирования требуются следующие растворы.

а) *Основные растворы для приготовления геля.* Раствор А_к: смешивают 48 мл 1 н. КОН (х. ч.) и 17,2 мл уксусной кислоты (х. ч.), прибавляют 4 мл N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина (ч.) и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл.

Раствор Б_к: смешивают 48 мл 1 н. КОН (х.ч.) и 2,87 мл уксусной кислоты (х. ч.), прибавляют 0,46 мл N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамина (ч.) и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл.

Раствор В_к: в дистиллированной воде растворяют сначала 0,4 г N, N'-метиленисакриламида, а затем 60,0 г акриламида, доводят объем до 100 мл и фильтруют.

Раствор Г_к: в дистиллированной воде растворяют сначала 2,5 г N, N'-метиленисакриламида, а затем 10,0 г акриламида, доводят объем до 100 мл и фильтруют.

Раствор Д_к: в 100 мл дистиллированной воды растворяют 4,0 мг рибофлавина и фильтруют перед использованием.

Раствор Е_к: в 100 мл дистиллированной воды растворяют 0,28 г персульфата аммония (х. ч.).

Все растворы, кроме Е_к, можно хранить несколько недель в склянках из темного стекла в холодильнике. Срок хранения раствора Е_к не должен превышать недели.

б) *Раствор мономеров для получения мелкопористого геля* (рН 4,3). Смешивают растворы А_к, В_к, Е_к и дистиллированную воду в соотношении 1 : 2 : 4 : 1. Если готовят гель для заполнения всех 12 трубок, то каждая часть соответствует 3,5 мл.

в) *Раствор мономеров для получения крупнопористого геля (рН 6,8).* Смешивают растворы Б_к, Г_к, Д_к и дистиллированную воду в соотношении 1 : 2 : 1 : 4. Во избежание спонтанной полимеризации после добавления раствора Д_к следует предохранять смесь от света. Если необходимо заполнить все 12 трубок прибора для диск-электрофореза, то одна часть соответствует 0,4 мл.

г) *Электродный буфер (рН 4,5).* К 62,4 г β-аланина (х. ч.) прибавляют 16,0 мл уксусной кислоты (х. ч.) и доводят объем дистиллированной водой до 2 л.

д) *Окрашивающий и отмывающий растворы.* Используются те же растворы, что и для щелочной системы анализа (см. стр. 90).

Колонку геля готовят точно так же, как и для щелочной системы анализа. Затем на ее верхнюю часть пипеткой наносят 0,2 мл раствора мономеров, предназначенного для приготовления крупнопористого геля. Еще выше осторожно настилают 5—8 мм разбавленного в 8 раз раствора Б_к. После этого трубки с гелем 15—20 мин освещают электрическими лампами мощностью 400—500 Вт на расстоянии 15—20 см до наступления полимеризации, о чем можно судить по появлению опалесценции геля. Жидкий слой сверху удаляют фильтровальной бумагой и вместо него наносят исследуемый раствор. В отличие от анализа в щелочной системе исследуемый раствор перед нанесением разводят в 8 раз разбавленным раствором Б_к. В остальном все элементы процедуры аналогичны щелочной системе анализа.

2. Одним из наиболее значительных преимуществ этого метода является его пригодность для исследования очень небольших количеств белка или пептидов. Это особенно ценно, например, для анализа разбавленных элюатов, получаемых при хроматографии и гель-фильтрации. Диск-электрофорез позволяет анализировать эти элюаты без предварительного концентрирования.

3. Окрашенные колонки геля можно продолжительное время хранить в пробирках с отмывающим раствором. Результаты фракционирования обычно регистрируют фотографически, причем удобнее всего фотографировать окрашенные колонки в таких пробирках.

4. *Диск-электрофорез в акриламидном геле, содержащем мочевины.* Раствор А: 8М раствор мочевины (24,0г перекристаллизованной мочевины растворяют в 50 мл деионизованной воды и муравьиной кислотой доводят рН до 3,2). Раствор Б: 30%-ный цианогум. Раствор В: 0,12 мл N, N', N'-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД) в 25 мл раствора А. Раствор Г: насыщенный раствор персульфата калия.

Приготовление геля. В вакуумной колбе смешивают 7 мл раствора Б, 3,5 мл раствора В и 17 мл раствора А и с помощью вакуумного насоса удаляют из смеси воздух. Затем добавляют 0,7 мл раствора Г и, смешав, заполняют полученным раствором стеклянные трубки прибора для диск-электрофореза, как рекомендуется

на стр. 90. Сверху на гелеобразующий раствор настилают 5—8 мм дистиллированной воды.

В буферные резервуары заливают раствор 5,5 М мочевины (330,0 г мочевины на 1000 мл воды), доведенный до pH 3,2 муравьиной кислотой.

Внесение исследуемого образца. Исследуемый раствор смешивают с равным объемом 40%-ной сахарозы и настилают на гель. Объем наносимого образца не должен превышать $\frac{1}{30}$ общего объема геля.

Процедуры электрофореза и окрашивания подобны тем, которые уже описаны на стр. 90.

Цитированная литература

1. Aronsson T., Grönwall A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., **9**, 128 (1957).
2. Benhamou E., Pugliese J., Chichn J. C., Amouch P., Presse méd., **62**, 65 (1954).
3. Cremer D., Tiselius, A., Biochem. Z., **320**, 273 (1950).
4. Ditterbrandt M., Am. J. Clin. Path., **18**, 439 (1948).
5. McDonald H. J., Bernes E. W., Biochim. Biophys. Acta, **17**, 290 (1955).
6. Durrum E. L., J. Colloid. Sci., **6**, 224 (1951).
7. Flodin P., Porath J., Biochim. Biophys. Acta, **13**, 696 (1954).
8. Folin C., Clocatcu V., J. Biol. Chem., **73**, 627 (1927).
9. Führ J., Hinz O. S., Klin. Wschr., **31**, 153 (1953).
10. Führ J., Hinz O. S., Klin. Wschr., **33**, 87 (1955).
11. Grassmann W., Hannig K., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., **290**, 1 (1952).
12. Jencks W. P., Durrum E. I., J. Clin. Invest., **34**, 1437 (1955).
13. Kabat E. A., Glusman M., Kuab V., Am. J. Med., **4**, 653 (1948).
14. Koverau E., Analyst, **79**, 681 (1954).
15. Kohn J., Protides Biol. Fluids, Elsevier Publ. Co., Amsterdam (1959).
16. Kōiw E., Grönwall A., Scand. J. Clin. Lab. Invest., **4**, 244 (1952).
17. Körver G., Klin Wschr., **28**, 693 (1950).
18. Kunkel H. G., Tiselius A., J. Gen. Physiol., **35**, 89 (1951).
19. Lillie R. D., Burtner H. J., J. Histochem., **1**, 8 (1953).
20. Ott H., Die med. Welt, **51**, 2697 (1960).
21. Ott H., Electrophorese in Acrylamid Gel, in: Protides Biol. Fluids, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1962.
22. Poulik M. D., Edelman G. M., Protides Biol. Fluids, **9**, 126 (1961).
23. Pucar Z., Z. Physiol. Chem., **269**, 62 (1954).
24. Röttger H., Naturwiss., **39**, 451 (1952).
25. Scheurlen P. P., Goll R., Klin. Wschr., **39**, 696 (1961).
26. Smithies O., Nature, **175**, 307 (1955).
27. Südhof H., Klin. Wschr., **36**, 536 (1958).
28. Swahn B., Scand. J. Clin. Lab. Invest., **4**, 98 (1952).
29. Uriel J., Scheidegger J. J., Bull. Soc. Chim. Biol., **37**, 165 (1955).

Рекомендуемая литература

- Bailey J. L., Techniques in Protein Chemistry, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1967. (Имеется перевод 1-го изд.: Дж. Бейли, Методы химии белков, изд-во «Мир», М., 1965.)
- Gordon H., Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels North Holland Publ. Co., Amsterdam, London, 1969.

- Leach S. J.* ed., Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Part A, Academic Press, New York and London, 1969.
- Smith I.*, Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Heinemann, London, 1969.
- Wieme R. J.*, Agar Gel Electrophoresis, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1965.
- Williams C. A.*, *Chase M. W.*, Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. II, Academic Press, New York, London, 1968.
- Wunderly C.*, in: P. Alexander and P. J. Block, A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry, Vol. 2, Pergamon Press, Oxford, 1960. (*Вундерли Х.*, в кн. Аналитические методы белковой химии, ИЛ, М., 1963, стр. 151, 167.)

Глава III

МЕТОДЫ СРЕДНЕ- И ВЫСОКОВОЛЬТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

М. ШАЙГО

Электрофорез на бумаге весьма часто применяют для разделения пептидов и качественного анализа аминокислот. Принцип, по которому классифицируются аппараты для электрофореза, обычно учитывает либо используемое напряжение, либо расположение листа бумаги в пространстве.

Аппаратом для средневольтного электрофореза называют прибор, обеспечивающий градиент напряжения от 20 до 40 В/см. К достоинствам таких приборов относится сравнительно умеренное теплообразование при электрофорезе. Даже если камера изготовлена из плохо проводящего тепло плексигласа, при электрофорезе данного типа можно обойтись простым водяным охлаждением. В то же время плексиглас настолько легко обрабатывается, что одну из существенных деталей прибора, а именно, охлаждающую плиту (см. ниже), можно изготовить в любой хорошо оснащенной подсобной мастерской.


Аппараты для высоковольтного электрофореза обеспечивают градиент напряжения от 50 до 100 В/см. В них специальное охлаждение становится обязательным. В горизонтальных камерах оно осуществляется с помощью металлической охлаждающей плиты, а в вертикальных — с помощью эффективного контакта с органическими растворителями.

Однако в ряде случаев, чтобы добиться необходимого разделения в аппаратах для средневольтного электрофореза, требуется значительно увеличивать продолжительность опыта. Этот недостаток в известной мере обесценивает ту легкость, с которой эти приборы можно изготовить даже в самой простой мастерской. С увеличением продолжительности электрофореза возрастает эффект диффузии, и границы зон теряют свою четкость. В то же время высоковольтный электрофорез при градиенте напряжения 50—100 В/см позволяет примерно в 2 раза сократить продолжительность опыта, что уменьшает диффузию и увеличивает четкость зональных границ.

С помощью электрофореза на бумаге можно выделять препаративные и идентифицировать малые количества аминокислот. Кроме того, электрофорез на бумаге лежит в основе анализа сложных

пептидных смесей, например ферментативных белковых гидролизатов, методом «отпечатков пальцев». Анализируемый этим методом препарат подвергается комбинированному электрофоретическому и хроматографическому разделению или комбинированному электрофоретическому разделению при разных значениях pH, причем как в том, так и в другом варианте разделение проводят в двух направлениях под прямым углом друг к другу.

Для упрощения переноса исследуемого материала из одной системы разделения в другую предложен прием «пришивания», который используют при электрофорезе на бумаге, анализируя пептидные карты. Участок фильтровальной бумаги, содержащий фракцию исследуемого материала, выделенную хроматографией или электрофорезом, вырезают и затем пришивают на швейной машине к новому листу фильтровальной бумаги. Этим приемом устраняется необходимость элюирования, которое обычно сопровождается нежелательными потерями материала. Фактически можно ограничиться элюированием только на конечном этапе очистки.

Перенос материала с помощью пришивания, а также использование специфических химических реакций с некоторыми боковыми группами аминокислотных остатков позволили разработать особый метод электрофореза, так называемый диагональный электрофорез. С его помощью можно довольно легко выделять пептиды, имеющие в своем составе цистеин, цистин, метионин, гистидин или лизин. 

А. АППАРАТ ДЛЯ СРЕДНЕВОЛЬТНОГО ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Электрофорез осуществляется при низкой температуре в небольших объемах буферного раствора на расположенной горизонтально фильтровальной бумаге при градиенте напряжения 30—40 В/см.

1. Описание аппарата. На фиг. 15 схематически изображен изготовленный в мастерской аппарат для горизонтального электрофореза с охлаждающей плитой из плексигласа размером 44 × 44 см. Циркуляция охлаждающей жидкости внутри плиты направляется особыми перегородками. В качестве такой жидкости применяют 50 %-ный этанол, охлаждаемый в специальном резервуаре смесью льда с ацетоном или с помощью холодильного агрегата. Температура охлаждающей плиты должна быть примерно +6° С. На плиту кладут смоченный буферным раствором лист фильтровальной бумаги, соединенный с электродными отсеками прибора бумажными фитилями, покрытыми целлофаном. Сверху лист фильтровальной бумаги закрывают пластинкой из плексигласа толщиной 15 мм, которая в трех точках плотно прижимается к охлаждающей плите.

Электродный отсек аппарата представляет собой прямоугольную камеру из плексигласа, разделенную на две части. В наружной части расположен электрод, изготовленный из платиновой проволоки 0,3 мм толщины; во внутреннюю часть погружаются фитили, соединяющие отсек с фильтровальной бумагой. Обе части электродного отсека соединяет мостик из влажной фильтровальной бумаги.

Источник тока снабжен плавным реостатом и обеспечивает максимально напряжение 2000 В и силу тока 150—200 мА.

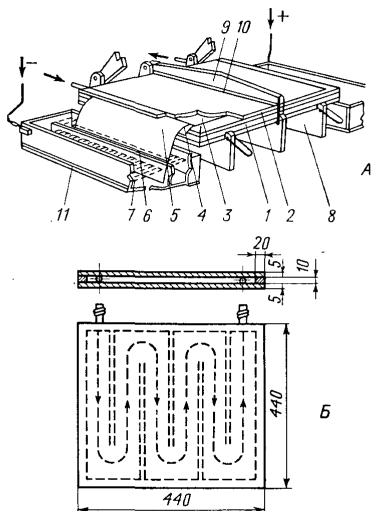
Охлаждающая жидкость циркулирует в системе под действием небольшого насоса.

2. Приготовление буферных растворов. 1) Буферный раствор pH 4,3—5,0 (величина pH определяется чистотой уксусной кислоты): смешивают 10 мл уксусной кислоты и 10 мл пиридина и разводят дистиллированной водой до 1000 мл.

2) Буферный раствор pH 6,5: смешивают 100 мл пиридина и 4 мл уксусной кислоты и разводят дистиллированной водой до 1000 мл.

3) Буферный раствор pH 2,0: смешивают 100 мл уксусной кислоты и 35 мл муравьиной кислоты и разводят дистиллированной водой до 1000 мл.

3. Обработка фильтровальной бумаги. На листе фильтровальной бумаги делают необходимую разметку и смачивают его соответствующим буферным раствором. Осторожно отжав избыток буферного раствора между несколькими слоями фильтровальной бумаги, этот лист накладывают на охлаждающую плиту. Затем, прикрыв сухим листом бумаги, распрямляют его резиновым валиком, используемым в фотографических лабораториях. На обращенные к электродам

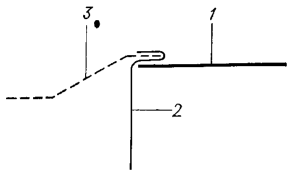


Фиг. 15. Схема прибора для горизонтального средневольтного электрофореза на бумаге с охлаждением.

А. 1 — охлаждающая плита (см. Б); 2 — пластинка, которая служит крышкой; 3 — лист фильтровальной бумаги; 4 — целлофановая мембрана; 5 — фитиль из фильтровальной бумаги; 6 — мостик из фильтровальной бумаги; 7 — электродный отсек; 8 — держатели охлаждающей плиты; 9 — деталь крепления; 10 — полоска губчатой резины; 11 — платиновые электроды.

концы листа фильтровальной бумаги накладывают полоски целлофана, длина которых несколько превышает ширину листа. Целлофановую полоску сгибают таким образом, чтобы она сверху и снизу охватывала конец бумажного фитиля (фиг. 16), который другим своим концом погружается в буферный раствор.

При нанесении слишком большого объема исследуемого материала может произойти его размывание на линии «старта». Для предотвращения размывания следует наносить небольшой объем достаточно концентрированного раствора пептидов.



Фиг. 16. Укладка фильтровальной бумаги в приборе для горизонтального электрофореза.

Чтобы предотвратить слишком интенсивный электроосмотический поток буферного раствора, фильтровальная бумага (1) контактирует с фитилем (3) через целлофановую мембрану (2).

Если приходится фракционировать значительный объем материала, желательно наносить его на сухую, а не на влажную бумагу. Большой объем наносимого материала, естественно, пропитывает значительную площадь бумаги. Если подсушивать место «старта», можно частично ограничить растекание наносимого раствора. Правда, в этом случае создается опасность необратимой адсорбции некоторых пептидов на бумаге; особенно это относится к больш-

шим пептидам, и поэтому такого подсушивания следует избегать. Однако, если область старта действительно занимает слишком большую площадь, наносимый материал можно сконцентрировать следующим способом. Сразу после нанесения образца бумагу кладут на чистое стекло. Увлажненную область «старта» с помощью двух стеклянных палочек приподнимают так, чтобы она не касалась стекла. Продвигая кончик пипетки параллельно линии «старта» примерно на расстоянии 1 см от увлажненной области, смачивают буферным раствором бумагу вокруг нее. Буферный раствор должен свободно выходить из пипетки и впитываться в бумагу. Увлажнение повторяют несколько раз по обе стороны стартовой зоны, пока она полностью не пропитается буферным раствором. После этого смачивают всю остальную площадь листа фильтровальной бумаги. Очень важно, чтобы нанесенный материал в стартовой области имел рН используемого буферного раствора. Особенно это существенно в тех случаях, когда лиофилизированный образец наносится в растворе аммиака. Поскольку этот раствор имеет более высокое значение рН, чем обычно используемый буферный раствор, важно, чтобы последний был достаточно емким. Обеспечить нужный рН в месте нанесения образца можно довольно простым приемом. Для этого бумагу вокруг стартовой зоны смачивают буферным

раствором и оставляют для легкого подсушивания (но не полного высушивания!). Достаточно проделать это три раза, чтобы в области нанесения образца установился рН буферного раствора. После этого избыток буферного раствора отжимают между слоями фильтровальной бумаги и кладут лист на охлаждающую плиту.

Подобное смачивание буферным раствором следует применять и при использовании приема «пришивания». Буферный раствор пипеткой наносят вдоль шва по обе стороны пришитого отрезка бумаги, пока оба фронта смачивания не сомкнутся. При этом содержащийся на пришитом отрезке бумаги материал будет впитываться на чрезвычайно узкой области «старта». Таким путем можно сконцентрировать материал на полоске шириной до 10—15 см. На бумагу Ватман 3 или 3 ММ можно нанести от 1 до 5 мг/см, а на бумагу Ватман 1 — от 1 до 5 мг на 10 см. В методе «отпечатков пальцев» на бумагу Ватман 3 и 3 ММ на линию старта шириной 1 см можно наносить максимально 3—4 мг исследуемого материала.

4. Электрофорез. После нанесения образца бумагу помещают в прибор, крышку плотно закрывают и включают ток. Для эффективного охлаждения очень важно, чтобы бумага была достаточно плотно прижата к охлаждающей плите. При использовании приема «пришивания» покрывающую стеклянную или плексигласовую пластинку 2 (фиг. 15,А) нельзя непосредственно приложить к бумаге, так как в местах, где пришиты полоски электрофореграммы, имеются утолщения. В этом случае между фильтровальной бумагой и покрывающей пластинкой прокладывают слой пенопласта, который нивелирует неровности и обеспечит равномерное прижатие бумаги. Разумеется, слой пенопласта следует изолировать от бумаги тонкой полиэтиленовой пленкой или же можно поместить пенопластовую прокладку в полиэтиленовый мешок. Электрофорез продолжается 90—120 мин, после этого прибор выключают, открывают крышку, стеклянными палочками вынимают влажную электрофореграмму и сушат ее в потоке теплого воздуха при 40—50°C.

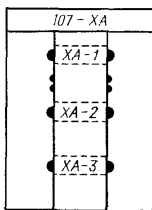
5. Окрашивание электрофореграммы. В аналитическом варианте метода высушенную электрофореграмму погружают в 0,5%-ный ацетон-нингидриновый или кадмий-нингидриновый раствор (см. стр. 192) и затем сушат 2—3 ч при 40—50°C.

Когда электрофорез ставят в препаративном варианте, на электрофореграмме окрашивают только края зон, как показано на фиг. 17. Согласно этим окрашенным полоскам, размечают остальные части электрофореграммы и проводят элюирование фракций.

После окрашивания электрофореграмм ацетон-нингидриновым раствором их необходимо зафиксировать. Для приготовления фиксатора смешивают 10 мл водного насыщенного раствора CuNO_3 , 0,2 мл азотной кислоты и 200 мл ацетона и полученную

смесь фильтруют. Окрашенную электрофореграмму погружают в этот фиксатор и затем высушивают на воздухе.

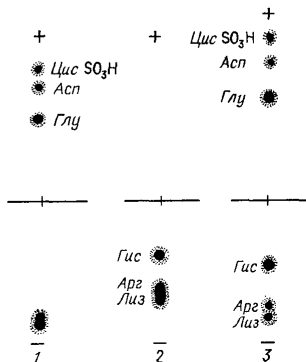
6. Качественное разделение аминокислотных смесей. Разделение и идентификацию всех аминокислот в полных кислотных гидролизатах белков и пептидов нельзя провести, используя лишь один



Фиг. 17. Электрофореграмма, на которой показано, как нужно отрезать край листа с разделенными фракциями для микропрепаративного выделения.

Отрезанную полоску окрашивают; руководствуясь ею, делают соответствующую разметку и проводят элюирование фракций.

метод электрофореза на бумаге. Например, весьма затруднительно в одних и тех же условиях идентифицировать как кислые (глутаминовая, аспарагиновая и цистеиновая), так и основные (гистидин, аргинин и лизин) аминокислоты. При pH 5,0 можно получить хорошее разделение глутаминовой, аспарагиновой и цистеиновой кислот, но в этих условиях плохо фракционируются основные аминокислоты и, очевидно, вовсе не разделяются нейтральные аминокислоты, так как при этом pH заряд их молекул близок к нулю. В то же время основные аминокислоты благодаря различным рК вполне удовлетворительно фракционируются в буферном растворе с pH 6,5, поскольку в этих условиях гистидин протонирован в незначительной степени. Кислые аминокислоты, наоборот, плохо разделяются при pH 6,5. Однако кислые и основные аминокислоты могут быть разделены одновременно на одной электрофореграмме с помощью электрофореза в двойной буферной системе [3]. Лист фильтровальной бумаги делят стартовой линией на две половины. Катодную половину, которая является областью миграции основных аминокислот, смачивают буферным раствором,

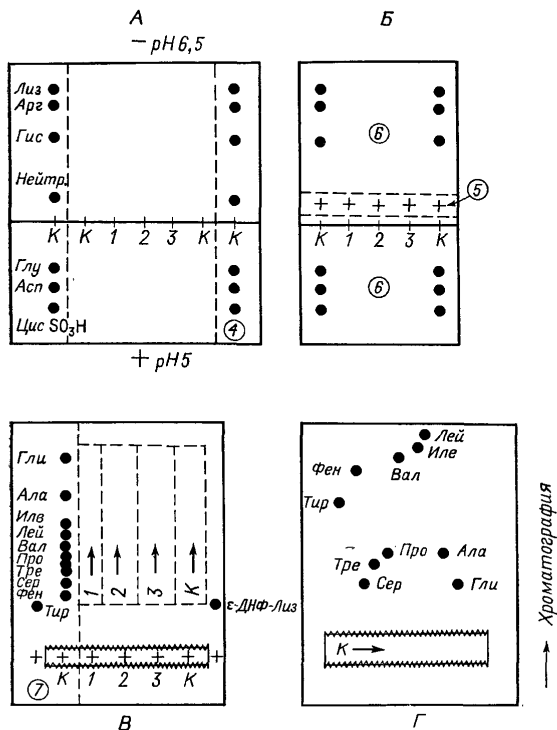


Фиг. 18. Одномерный электрофорез на бумаге.

1 — при pH 5,0; 2 — при pH 6,5; 3 — в системе с обоими буферными растворами.

имеющим рН 6,5, а анодную пропитывают буферным раствором с рН 5,0 (фиг. 18).

Нейтральные аминокислоты не разделяются ни в одном из этих буферных растворов, но их фракционирование можно осуществить при последующем электрофорезе в других условиях, а также с помощью хроматографии. Перенос фракции нейтральных аминокислот в другую систему очень удобно сделать путем пришивания (фиг. 19). Для полной идентификации аминокислот гидролизаты наносят на сухую фильтровальную бумагу. Чем меньше площадь, которую занимает нанесенный образец на бумаге, тем лучше будет



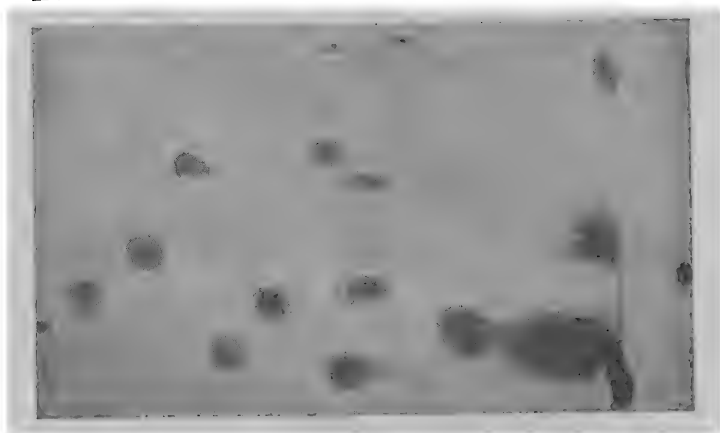
Фиг. 19. Трехэтапное разделение аминокислот.

А и Б. Электрофорез в системе с двумя буферными растворами. В. Электрофорез при рН 1,9. Г. Хроматография.

разделение. Поэтому, чтобы уменьшить растекание образца, нанесение сопровождается подсушиванием. В центре листа бумаги размечают линию старта и через 3 см друг от друга наносят исследуемые образцы 1, 2 и 3 (фиг. 19,А). По обе стороны от них наносят по два контрольных образца (К). На первом этапе анализа проводят электрофорез с двумя буферными растворами. Катодную часть электрофореграммы смачивают буферным раствором, имеющим рН 6,5, а анодную — рН 5,0. Средневольтный электрофорез проводят около 1,5 ч, затем электрофореграмму извлекают из аппарата, сушат и с двух сторон отрезают полоски фильтровальной бумаги, на которых фракционировались контрольные образцы. Эти полоски 4 окрашивают нингидрином (фиг. 19,А). На окрашенных контрольных электрофореграммах можно идентифицировать кислые и основные аминокислоты исследуемых гидролизатов и установить локализацию нейтральных аминокислот. Из исходной электрофореграммы по пунктирным линиям (фиг. 19,Б) вырезают полоску 5, содержащую только нейтральные аминокислоты. Обе оставшиеся части листа, обозначенные цифрой 6, окрашивают нингидрином и идентифицируют содержащиеся в них кислые и основные аминокислоты путем сопоставления с контрольными электрофореграммами. Полоску бумаги, содержащую нейтральные аминокислоты, на швейной машине зигзагообразным швом пришивают к новому листу фильтровальной бумаги.

Следующий этап электрофореза проводится в буферном растворе, имеющем рН 1,9 или 2,0. Поэтому полоску бумаги с нейтральными аминокислотами нужно пришить на анодном краю листа так, чтобы она служила стартовой зоной. При рН 1,9—2,0 диссоциация всех карбоксильных групп аминокислотных молекул подавлена, и в связи с этим все нейтральные компоненты смеси ведут себя как катионы. Пришив полоску бумаги, лист переворачивают и лезвием бритвы осторожно вырезают тот его участок, который расположен под пришитой полоской. Это необходимо делать осторожно, чтобы не повредить швы и саму полоску. Затем фильтровальную бумагу смачивают буферным раствором, имеющим рН 1,9 или 2,0, как описано выше. В качестве маркера рядом с пришитой полоской наносят ϵ -ДНФ-лизин. Электрофорез проводят до тех пор, пока этот маркер не мигрирует на 8—10 см по направлению к катоду.

По окончании электрофореза бумагу вновь высушивают, вырезают одну из контрольных полосок 7 (фиг. 19,В) и окрашивают ее. С ее помощью можно определить, как далеко мигрировали нейтральные аминокислоты. Установив это, разрезают электрофореграмму (по пунктирным линиям) на полоски, содержащие нейтральные аминокислоты из образцов 1—3, а также из контрольного образца К. Каждую из этих полосок в свою очередь пришивают к новому листу фильтровальной бумаги и подвергают хроматогра-



Фиг. 20. Пептидная карта триптического гидролизата D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

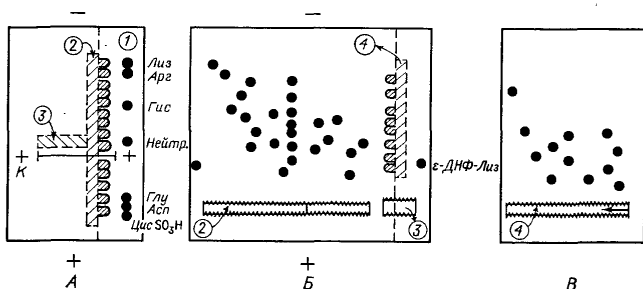
фии в системе бутанол — уксусная кислота — вода (фиг. 19,Г) в направлении, перпендикулярном направлению электрофореза. Такая трехэтапная система анализа позволяет надежно идентифицировать каждую из аминокислот, содержащихся в исследуемом гидролизате.

Гидролизаты коротких пептидов, в составе которых имеются аминокислоты одного-двух видов, можно анализировать по сокращенной программе, проводя вместо трехэтапного двухэтапное разделение.

7. Анализ ферментативных гидролизатов белков. В 1957 г. Ингрэм [6] впервые показал, что двухэтапным разделением с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге можно анализировать сложные пептидные смеси, ферментативные гидролизаты и т. п. Такой анализ выявляет самые незначительные различия, с которыми можно встретиться, например, при изучении видовой специфичности или в других сравнительных исследованиях. Метод «отпечатков пальцев» можно назвать одним из важнейших методов современной биохимии, молекулярной биологии и иммунохимии, так как он позволяет выделить в чистом виде определенный пептид или провести микропрепаративное разделение сложной смеси.

В качестве классического примера метода «отпечатков пальцев» на фиг. 20 приведена картина, полученная в результате фракционирования триптического гидролизата D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

На первом этапе проводят горизонтальный электрофорез при рН 4,3—5,0. 3—4 мг исследуемого материала наносят на бумагу в зоне шириной 1 см перпендикулярно направлению миграции. Электрофорез продолжается 2—3 ч, затем бумагу высушивают и, повернув на 90°, проводят восходящую хроматографию. В качестве растворителя используют смесь изоамиловый спирт — пиридин — вода (35 : 35 : 30). Хроматографию заканчивают, когда фронт растворителя достигает верхнего края бумаги. Хроматограмму



Фиг. 21. Трехэтапный анализ белкового гидролизата.

А. Электрофорез при рН 6,5. Б. Электрофорез при рН 1,9. В. Хроматография. См. текст.

высушивают и окрашивают так же, как и электрофореграмму при горизонтальном электрофорезе.

В последнее время метод «отпечатков пальцев» все чаще осуществляют в три этапа, комбинируя два электрофоретических разделения с хроматографией. Дело в том, что двухэтапный метод «отпечатков пальцев» не всегда дает полное разделение, особенно при анализе ферментативных гидролизатов высокомолекулярных белков, поэтому возникает необходимость дополнительного электрофоретического фракционирования (фиг. 21).

На первом этапе лучше всего провести электрофорез в буферном растворе с рН 6,5 или 5,0 либо в двухбуферной системе. Весьма трудно дать определенные рекомендации относительно величины рН буферного раствора, так как вариации электрофоретической подвижности у белков и пептидов гораздо значительнее, чем у аминокислот. Поэтому на первом этапе разделения величину рН буферного раствора следует подобрать эмпирически. Опытным путем необходимо также определить наиболее подходящее месторасположение стартовой зоны и оптимальную продолжительность электрофореза, поскольку компоненты разделяемой смеси могут

иметь весьма варьирующую электрофоретическую подвижность. Анализ неизвестной смеси пептидов следует начинать с предварительного электрофоретического опыта, который позволит установить эти параметры.

После электрофоретического разделения на первом этапе контрольную полосу 1 (фиг. 21, А) окрашивают и, используя ее как образец для сравнения, из неокрашенной части бумажного листа вырезают полосу 2 шириной примерно 1 см (фиг. 21, А). Эту полосу пришивают на новый лист бумаги для второго электрофоретического разделения (фиг. 21, Б), которое обычно проводят при pH 2,1 или 1,9. При pH 1,9 нельзя ожидать полного разделения ферментативных белковых гидролизатов из-за сложного состава зоны 3 нейтральных аминокислот. Поэтому, установив месторасположение этой зоны на первой электрофореграмме, ее вырезают и пришивают рядом с полоской 2 (фиг. 21, Б). Электрофорез продолжается до тех пор, пока нанесенный в качестве маркера ϵ -ДНФ-лизин не продвинется примерно на 10—13 см в сторону катода. После высушивания бумагу окрашивают почти целиком, за исключением полоски 4 (фиг. 21, Б), которая содержит мигрирующие из отрезка 3 нейтральные компоненты. Полоску 4 пришивают к новому листу и подвергают хроматографии в соответствующей системе (фиг. 21, В). Трехэтапный анализ позволяет с наибольшей достоверностью установить количество пептидных компонентов, возникающих в результате ферментативного гидролиза высокомолекулярных белков. Такого рода данные чрезвычайно важны, например, при определении аминокислотной последовательности.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Чем меньше буферного раствора содержится в фильтровальной бумаге, тем выше разрешающая способность горизонтального электрофореза. Поэтому перед нанесением образца следует особенно тщательно удалять избыток буферного раствора промоканием.

2. Если образуются зоны неправильной формы с краевой деформацией или если фронт миграции не параллелен электродам, необходимо проверить правильность закрепления крышки. Под недостаточно прижатой или искривленной крышкой бумага становится неравномерно смоченной, так как высыхает в некоторых участках, а это может быть причиной подобных аномалий. Если крышка закреплена хорошо, но тем не менее эти явления не исчезают, следует проверить правильность укладки полосок целлофана. При слишком коротких целлофановых прокладках фильтровальная бумага с одной или с обеих сторон может контактировать непосредственно с фитилем. Это вызовет усиленный поток буферного раствора в месте контакта и как следствие этого — нарушение формы зон. При высо-

ковольтном горизонтальном электрофорезе эффект электроэндоосмоса менее выражен, поэтому можно обходиться без целлофановых прокладок.

3. При анализе методом «отпечатков пальцев» рекомендуется хроматографию так же, как и электрофорез, проводить при низкой температуре, если это возможно. Исходя из нашего опыта, можно отметить, что самая высокая разрешающая способность наблюдается при $+4^{\circ}\text{C}$.

Б. МЕТОД ДИАГОНАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Некоторые боковые группы аминокислотных остатков могут быть модифицированы в специфических реакциях и в результате у них может измениться заряд. Большая часть таких реакций может быть проведена с аминокислотами и пептидами, адсорбированными на бумаге.

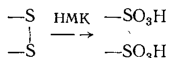
Благодаря специфичности этих реакций изменение заряда касается только тех пептидов, которые имеют в своем составе определенную аминокислоту. Поэтому само явление изменения заряда можно использовать для выделения пептидов, содержащих соответствующие аминокислоты из такой многокомпонентной смеси, как ферментативный белковый гидролизат.

1. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЦИСТИН [1]

Белок, содержащий цистин и, следовательно, имеющий дисульфидные связи, подвергают ферментативному гидролизу. Следует подобрать такой фермент, который обеспечит получение мелких пептидов, т. е. расщепит цепь во многих точках. Наименее пригоден для этой цели трипсин из-за высокой избирательности действия, а также из-за хорошо известной устойчивости белков, содержащих дисульфидные связи, к триптическому гидролизу.

Сначала полученный гидролизат подвергают препаративному электрофорезу на бумаге, например при pH 6,5. Закончив электрофорез, бумагу высушивают и окрашивают контрольную полоску 1 (фиг. 22,А). Ориентируясь по ней, определяют месторасположение тех компонентов гидролизата, которые мигрировали на наибольшее расстояние от линии старта в сторону катода и анода, и в соответствии с этим вырезают полоску 2 шириной 1 см. Ее помещают в эксикатор, содержащий надмуравьиную кислоту [смесь перекиси водорода — муравьиная кислота (1 : 5)], и создают вакуум. Через 2 ч инкубации при комнатной температуре полоску переносят в другой вакуумный эксикатор с NaOH и удаляют пары надмуравьиной кислоты. Затем сухую полоску пришивают к новому листу (фиг. 22,Б) на том же расстоянии от края бумаги, на

В результате окисления надмуравьиной кислотой (НМК) этот дисульфидный мостик разрушается и возникают две сильноокислотные группы:



Появление таких групп означает увеличение отрицательного заряда на 2 единицы. При втором электрофоретическом разделении пептид, изменивший свой отрицательный заряд на две единицы, займет положение компонента X (фиг. 22,Б), более близкое к аноду по сравнению с другими, не изменившими своих зарядов компонентами смеси, располагающимися по диагонали. Диагональное расположение всех остальных пептидов обусловлено тем, что, не изменив заряда, они сохранили также неизменной свою подвижность относительно друг друга.

Проведя аналитический диагональный электрофорез, определяют локализацию зоны компонента X на препаративной электрофореграмме и вырезают участок, содержащий искомую фракцию Z (фиг. 22,В). Этот отрезок бумаги точно так же, как и аналитическую электрофореграмму, обрабатывают надмуравьиной кислотой, затем пришивают к новому листу бумаги и подвергают электрофорезу при pH 6,5 (фиг. 22,Г). На окрашенной контрольной полоске обычно можно обнаружить две зоны. Одна из них содержит компоненты, локализующиеся диагонально; в данном случае они не представляют для нас интереса. Другая зона располагается ближе к аноду, чем первая. Именно в ней находятся пептиды, содержащие цистеиновую кислоту, причем чаще всего в достаточно гомогенном виде.

При ферментативном гидролизе дисульфидная связь между двумя остатками цистеина, образующими дисульфидный мостик, может разорваться еще до воздействия надмуравьиной кислотой. Дисульфидный мостик может также связывать две разные цепи друг с другом. В этих случаях после разрушения дисульфидных связей при диагональном электрофорезе можно обнаружить два смещенных компонента.

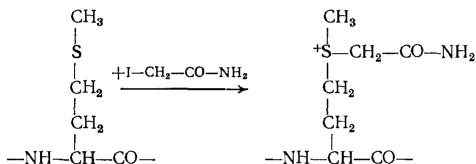
2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ МЕТИОНИН [11]

Полипептидные цепи можно избирательно разрушить по остаткам метионина с помощью бромциана. Разумеется, анализ полученной смеси не позволит восстановить последовательность фрагментов в исходной полипептидной цепи. Однако такого рода избирательное расщепление оказывает существенную помощь в изучении первичной структуры. Если определить небольшое число остатков с N- и C-концов бромциановых пептидов и если после фер-

ментативного или химического гидролиза удается выделить пептиды, содержащие метионин, и затем определить их аминокислотную последовательность, то на основании всех этих данных можно расположить в правильном порядке все фрагменты пептидной цепи, полученные при расщеплении бромцианом.

Пептиды, содержащие метионин, можно выделить методом диагонального электрофореза. В основе метода лежит специфическая реакция метионина с иодацетамидом в кислой среде; в результате образуется карбаомилметилсульфониевая соль метионина (КМ-метионин).

В этой реакции происходит окисление серы и суммарный заряд пептида изменяется на $+1$ единицу:



Методика диагонального электрофореза аналогична процедуре, проиллюстрированной на фиг. 22. Неполный гидролизат, содержащий пептиды с метионином, подвергают электрофорезу. После окрашивания контрольной полоски вырезают аналитическую электрофореграмму, смачивают ее 0,1 М раствором иодацетамида в пиридин-ацетатном буферном растворе с pH 3,5 (пиридин—уксусная кислота—вода (1 : 10 : 90)). Смачивание производят осторожно распылителем или пипеткой. Необходимо, чтобы бумага пропиталась полностью, но не содержала избытка влаги. Влажную полосу на 14—16 ч помещают в эксикатор при комнатной температуре. На дно эксикатора наливают буферный раствор pH 3,5 для создания соответствующей атмосферы. Необходимо следить, чтобы в эксикаторе части бумажной полоски не соприкасались друг с другом. После инкубации электрофореграмму высушивают на воздухе и избыток иодацетамида удаляют отмыванием в ацетоне, 3—4 раза погружая в него полосу. Сухую полосу пришивают к новому листу фильтровальной бумаги и подвергают электрофорезу, используя тот же самый буферный раствор, который применялся при первом электрофорезе, но проводя разделение под прямым углом к первоначальному направлению. Пептиды, содержащие метионин, благодаря изменению суммарного заряда на $+1$ единицу сместятся в сторону катода от диагонали, по которой располагаются другие пептиды.

Последовательность аминокислот, выделенных таким путем в пептидах, содержащих КМ-метионин, можно анализировать затем обыч-

ными методами. Кроме того, можно произвести избирательное расщепление таких пептидов. Если их в течение 2 ч инкубировать при 100°C в запаянной ампуле, произойдет расщепление по остаткам метионина с превращением их в гомосерин или в гомосерин-лактон.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ГИСТИДИН

При pH 6,0 остатки гистидина в полипептидных цепях специфически реагируют с диэтилпирокарбонатом, в результате чего они превращаются в остатки карбэтоксигистидина [7]. Образовавшийся остаток карбэтоксигистидина не может быть протонирован, т. е. карбэтоксилирование сопровождается потерей заряда этим остатком. В щелочной среде карбэтоксильная группа освобождается и вновь появляется гистидин. Это обратное превращение карбэтоксигистидина в гистидин приводит к увеличению суммарного заряда молекулы на +1 единицу. Реакция карбэтоксилирования в первую очередь имеет значение при анализе остатков гистидина, играющих прямую или косвенную роль в функционировании нативных белков. Использование этой реакции в диагональном электрофорезе позволяет выделить из ферментативного гидролизата такого белка пептиды, имеющие в своем составе модифицированные остатки гистидина.

Исследуемый белок растворяют в фосфатном буферном растворе pH 6,0 и, добавляя свежеприготовленный раствор диэтилпирокарбоната в этаноле, проводят карбэтоксилирование. Соотношение гистидин/диэтилпирокарбонат должно составлять 1 : 10. Рассчитанное, исходя из этого соотношения, количество диэтилпирокарбоната разбавляют в 5 раз этанолом. После инкубации в течение 1 ч, во время которой, кроме карбэтоксилирования, происходит также разрушение избытка диэтилпирокарбоната, раствор белка необходимо обессолить гель-фильтрацией или диализом. Число связанных карбэтоксильных групп можно определить спектрофотометрически; их коэффициент молярной экстинкции при 240 nm равен 3 260 [9].

Затем карбэтоксилированный белок гидролизуют каким-либо ферментом, функционирующим в интервале pH от 6 до 8. Вне этого интервала карбэтоксильные связи нестабильны. Удобнее всего вести гидролиз в автотитраторе при тщательном перемешивании и непрерывном добавлении щелочи, поддерживая pH смеси на постоянном уровне и не допуская локального защелачивания.

Ферментативный гидролизат лиофилизируют и затем подвергают электрофорезу. При pH 5 гистидин полностью ионизирован, поэтому наибольшего различия в электрофоретической подвижности между пептидами, содержащими гистидин и карбэтоксигистидин, следует ожидать именно в этих условиях. В связи с этим электро-

форез обычно проводят при pH 5. После окрашивания контрольной полоски вырезают аналитическую электрофореграмму, помещают ее в эксикатор над 5 н. раствором аммиака и инкубируют при комнатной температуре 6 ч.

После инкубации электрофореграмму высушивают и снова подвергают электрофорезу при pH 5 в перпендикулярном направлении. В парах аммиака происходит отщепление карбэтоксильных групп, гистидиновые остатки становятся доступными протонированию, и при электрофорезе пептиды, содержащие гистидин, смещаются от занимаемого другими пептидами диагонального положения в сторону катода.

Установив с помощью аналитического диагонального электрофореза локализацию зоны пептидов с гистидином на препаративной электрофореграмме, ее вырезают и после обработки парами аммиака вновь подвергают электрофоретическому разделению в препаративном масштабе.

4. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЛИЗИН

Анализ пептидов, содержащих лизин, из ферментативного (но не триптического!) или частичного химического гидролизата является важным этапом расшифровки аминокислотной последовательности белков. Выделение пептидов, содержащих лизин, следует начать с обратимого блокирования ϵ -аминогрупп остатков лизина в исследуемом белке. Такую обратимую модификацию можно получить при трифторацетилировании [5], малеинировании [2] или цитраконилировании [4].

Перед трифторацетилированием SH-группы исследуемого белка карбоксиметилируют или окисляют надмуравьиной кислотой. 100 мг белка растворяют в 10 мл 8 М раствора мочевины и к этому раствору при тщательном перемешивании в три приема добавляют 3 мл этилтиотрифторацетата, поддерживая pH около 10 с помощью 5 н. раствора NaOH. После внесения последней порции этилтиотрифторацетата pH понижают до 6 и удаляют мочевину и избыток реагента, диализуя смесь против дистиллированной воды или 1%-ного раствора бикарбоната аммония. В результате трифторацетилирования ϵ -аминогруппы остатков лизина блокируются трифторацетильными группами, и поэтому они не могут быть протонированы. Далее модифицированный белок подвергают ферментативному гидролизу, следя за тем, чтобы pH не превысил 8,2, так как в более щелочной среде трифторацетильные группы отщепляются. Гидролизат подвергают электрофоретическому разделению, затем из электрофореграммы вырезают полоску для аналитического диагонального электрофореза и помещают ее на 4 ч в эксикатор над 5 н. раствором аммиака. В щелочной среде происходит отщепление трифторацетильных групп и регенерация ϵ -аминогрупп, кото-

рые вновь становятся доступными протонированию. В результате протонирования заряд каждого остатка лизина изменяется на +1 единицу. Поэтому при электрофорезе происходит смещение пептидов, содержащих лизин, от диагонального положения остальных компонентов по направлению к катоду [10].

Обратимое блокирование ϵ -аминогрупп можно также получить в результате реакций малеинирования или цитраконилирования. В этих реакциях происходит включение карбоксильной группы в ϵ -аминогруппу с изменением ее заряда.

Для малеинирования исследуемый белок растворяют в 8 М мочеvine, содержащей 0,1 М пироглутамата, до концентрации 10 мг/мл. В этот раствор вносят одну каплю фенолфталеина и в три приема добавляют 30 молярных эквивалентов чистого малеинового ангидрида (в расчете на количество аминогрупп), тщательно перемешивая раствор. Непрерывно подавая 10%-ный раствор NaOH, pH этой смеси постоянно поддерживают в зоне перехода окраски фенолфталеина. По окончании реакции (через 10—12 мин) мочеvinу удаляют диализом против дистиллированной воды или гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 (крупнозернистый).

Реакцию цитраконилирования проводят так же, как и реакцию малеинирования, в 8 М растворе мочеvinу, содержащем 10 мг/мл белка, в автотитраторе. Величина pH поддерживается на постоянном уровне с помощью непрерывной подачи 10%-ного раствора NaOH. К раствору белка в три приема при тщательном перемешивании прибавляют 30 молярных эквивалентов цитраконового ангидрида (в расчете на количество аминогрупп). В конце реакции смесь обессоливают диализом или гель-фильтрацией.

Для ферментативного гидролиза малеинированных и цитраконилированных белков можно использовать почти все протеолитические ферменты, за исключением пепсина, оптимум действия которого находится при кислом pH. Частичный кислотный гидролиз в данном случае также не пригоден. После ферментативного гидролиза проводят препаративный электрофорез, затем вырезают полоску для аналитического диагонального электрофореза и помещают ее в вакуумный эксикатор. Если анализируется малеинированный белок, то в эксикаторе находится буферный раствор, состоящий из 1%-ного пиридина и 5%-ной уксусной кислоты; в эксикаторе создается вакуум и его помещают на 16 ч в термостат при 60°C. Если анализу подвергается цитраконилированный белок, то в эксикаторе содержится 0,05 М уксусная кислота, и после создания вакуума его помещают в термостат при 37°C на 6 ч. После инкубации полоски высушивают, пришивают к новым листам фильтровальной бумаги и подвергают электрофорезу в направлении, перпендикулярном первоначальному. При отщеплении ацильных групп происходит регенерация аминогрупп, имеющих заряд +1. Поскольку блокирующая карбоксильная группа имела заряд -1,

то после удаления блокирующего агента происходит суммарное увеличение заряда на $+2$ единицы. Такое изменение заряда приводит к весьма значительному смещению пептидов, содержащих лизин, в сторону катода [2, 4].

5. ВЫДЕЛЕНИЕ С-КОНЦЕВОГО ПЕПТИДА ИЗ ТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ [8]

Благодаря специфичности триптического гидролиза возникающие в ходе его пептиды имеют на С-конце лизин или аргинин, за исключением С-концевого пептида самого белка (если, конечно, на его С-конце не находится ни лизин ни аргинин). Карбоксипептидаза В специфически отщепляет С-концевые основные аминокислоты, что приводит к потере зарядов в концевых пептидах. Если пептид не имеет на С-конце ни лизина, ни аргинина, т. е. действительно является С-концевым пептидом белка, то после обработки карбоксипептидазой он не потеряет своего заряда.

Исследуемый белок гидролизуют трипсином и гидролизат подвергают электрофорезу на бумаге. Ориентируясь по контрольной полоске, вырезают полоску для аналитического диагонального электрофореза и осторожно опрыскивают ее карбоксипептидазой В, растворенной в 0,1%-ном бикарбонате аммония. Опрысканную полоску на 1 ч помещают в эксикатор, содержащий воду, при 37°C . После инкубации полоску высушивают и подвергают вновь электрофорезу под прямым углом к первоначальному направлению.

Все пептиды, у которых на С-конце находится лизин или аргинин, смещаются от диагонального положения, в котором остается только С-концевой пептид исследуемого белка.

В. МЕТОД ВЫСОКОВОЛЬТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

При высоковольтном электрофорезе градиент напряжения равен 50—100 В/см. Сила используемого тока также увеличивается, а следовательно, возрастает теплообразование и повышается температура бумаги. Для рассеяния образующегося тепла необходимо более эффективное охлаждение.

В горизонтальных аппаратах для высоковольтного электрофореза одного типа охлаждение обеспечивается циркуляцией водопроводной воды в охлаждающей плите, изготовленной из металла. Металлическую плиту, разумеется, необходимо отделить от фильтровальной бумаги полиэтиленовой пленкой с соответствующими изоляционными свойствами. В аппаратах для высоковольтного электрофореза с водяным охлаждением фильтровальная бумага охлаждается и сверху и снизу двумя плитами, которые прижимаются друг к другу надувным резиновым кольцом. Если в ходе эксперимента применяли пришивание, то, для того чтобы обеспечить

равномерное давление на бумагу, ее приходится покрывать слоем пенопласта, но в этом случае теряется охлаждающий эффект одной из плит. Те части бумажного листа, которые выступают за пределы охлаждающей плиты, вовсе не охлаждаются. Поэтому, например, фитиль из фильтровальной бумаги, погруженный в электродный отсек, должен быть двухслойным, чтобы быстро компенсировать потерю буферного раствора при нагревании и не допускать высыхания бумаги.

Аппараты для высоковольтного электрофореза, относящиеся к другой группе, устроены таким образом, что фильтровальная бумага погружена в охлаждающую жидкость, не смешивающуюся с водой; тепло, воспринятое этой жидкостью, поглощается затем в системе водяным охлаждением. В таких аппаратах бумага помещается вертикально между двумя ваннами, содержащими буферный раствор. В связи с вертикальной укладкой бумаги важно правильно выбрать полярность электродов. Из-за электроэндоосмоса происходит перемещение буферного раствора от анода к катоду. Если, например, отрицательный полюс источника тока соединить с верхней ванной, то специфическое образование «хвостов» при электрофорезе, вызванное электроэндоосмотическим потоком снизу вверх, будет полностью компенсировано неспецифическим образованием «хвостов», обусловленным движением буферного раствора сверху вниз под влиянием силы тяжести.

Хорошая охлаждающая жидкость не должна смешиваться с водой, должна иметь высокую теплоемкость и высокую температуру вспышки. Высыхание бумаги во время электрофореза вызывает увеличение электрического сопротивления в цепи, что в свою очередь может привести к искровому разряду. Если охлаждающая жидкость имеет низкую температуру вспышки, создается опасность пожара, так как электрофоретическая камера наполнена 50—80 л легковоспламеняющейся жидкости. Обычно используют в качестве охлаждающей жидкости толуол, который имеет вполне подходящую теплопроводность, но слишком низкую температуру вспышки и поэтому легко воспламеняется. В отличие от толуола фракция нефти, известная под коммерческим названием «уайт-спирит», имеет довольно высокую температуру вспышки. Кроме нее, можно использовать также четыреххлористый углерод, который не воспламеняется, но плохо проводит тепло.

Существенное преимущество аппаратов для высоковольтного электрофореза заключается в том, что они позволяют значительно сократить продолжительность электрофореза, а следовательно, уменьшить диффузию и сделать границы зон более четкими.

Все методы, описанные для средневольтного электрофореза, без каких-либо изменений можно воспроизвести на аппаратах для высоковольтного электрофореза. Исключение составляет двухбуферная система. Как известно, в аппаратах с непосредственным

жидкостным охлаждением буферный раствор, находящийся в ваннах, насыщает охлаждающую жидкость, а между буферным раствором и бумагой во время электрофореза устанавливается равновесие. В связи с этим стабилизация двух буферных систем на одном листе бумаги становится недостижимой.

В электрофоретических аппаратах с непосредственным жидкостным охлаждением для данного буферного раствора необходимо использовать один и тот же резервуар; буферный раствор достаточно менять раз в неделю. Буферный раствор с другим рН можно использовать только с новой порцией охлаждающей жидкости

Цитированная литература

1. *Brown J. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **101**, 214 (1966).
2. *Butler R. J. G., Harris J. I., Hartley B. S., Leberman R.*, Biochem. J., **103**, 78P (1967).
3. *Dévényi T.*, Magy. Kém. Folyóirat, **69**, 538 (1963).
4. *Dixon H. B. F., Perham R. N.*, Biochem. J., **109**, 312 (1968).
5. *Goldberger R. F., Anfinsen C. B.*, Biochemistry, **1**, 401 (1962).
6. *Ingram V. M.*, Nature, **180**, 326 (1957).
7. *Mühlrad A., Hegyi Gy., Toth G.*, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **2**, 19 (1967).
8. *Naughton M., Hagopian H.*, Anal. Biochem., **3**, 276 (1962).
9. *Ovádi J., Libor S., Elödi P.*, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., **2**, 455 (1967).
10. *Perham R. N., Jones G. M. T.*, Eur. J. Biochem., **2**, 87 (1967).
11. *Tang J., Hartley B. S.*, Biochem., J. **102**, 593 (1967).

Рекомендуемая литература

- Bailey L. J.*, Techniques in Protein Chemistry, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, London, New York, 1967.
- Hartley R. J.*, Biochem., J., **119**, 805 (1970).
- Leach S. J.* ed., Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Part. A, Academic Press, New York, London, 1969.
- Smith I.*, Chromatographic and Electrophoretic Techniques II, Zone electrophoresis, Heinemann Medical Books Ltd., London, 1960.
- Zweig G., Whitaker J. R.*, Paper Chromatography and Electrophoresis, Vol. I, Academic Press, New York, London, 1967.

Глава IV

МЕТОДЫ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

А. ПОЛУЧЕНИЕ ИММУННОЙ СЫВОРОТКИ

Для реакции преципитации необходимо иметь специфические антисыворотки достаточно высокого титра. В лабораторных условиях кролик — наиболее удобный продуцент таких антисывороток. Существует два типа схем иммунизации животных-продуцентов: 1) иммунизация без введения адъювантов (вещества, стимулирующие образование антител) и 2) иммунизация с адъювантами.

Независимо от схемы иммунизации одним и тем же антигеном следует одновременно иммунизировать группу животных, так как обычно наблюдаются весьма большие индивидуальные различия в иммунном ответе. Чем больше группа иммунизируемых животных, тем выше вероятность получения антисыворотки достаточно высокого титра в наиболее короткий срок. Это особенно важно при получении антисыворотки к смеси белков, например при иммунизации кроликов белками сыворотки крови для получения антисыворотки, используемой в иммуноэлектрофорезе. Именно в этом случае можно ожидать образования антител к ряду компонентов смеси. Для получения антисыворотки к белковым антигенам вполне достаточно иммунизировать 1%-ными белковыми растворами. Белок обычно растворяют в 0,15 М растворе NaCl; этим же раствором разбавляют сыворотку крови для иммунизации.

В литературе описано очень много разных способов иммунизации. Вряд ли можно рекомендовать какую-либо одну универсальную схему иммунизации, так как ее эффективность определяется множеством факторов. Иммунный ответ зависит от свойств вводимого антигена, вида животных-продуцентов, индивидуальных различий иммунизируемых животных и т. д. Ниже мы приводим несколько схем иммунизации.

1. СХЕМЫ ИММУНИЗАЦИИ БЕЗ АДЪЮВАНТА

А. Ежедневно в течение первых пяти дней в ушную вену кролика вводят возрастающие количества раствора белкового антигена в дозах 1, 2, 4, 8 и 16 мг (концентрация белка в сыворотке крови обычно около 7%). Затем делают недельный перерыв, после которо-

го серию инъекций повторяют. На четвертой неделе иммунизации под кожу животному вводят раствор антигена, содержащий 25 мг белка; в последующие 3 дня вводят еще по 20 мг белка в ушную вену. На 7—9-й день после последней инъекции у животного берут кровь, получают сыворотку и определяют титр антител [11].

Б. Курс иммунизации длится 4 нед. Однократная доза составляет 1—2 мл 1%-ного раствора белкового антигена. На первой неделе в первые три дня делают по одной инъекции в ушную вену. В каждую из последующих трех недель в первый день иммунизируют внутрибрюшинно, а на второй и третий — внутривенно. Через неделю после иммунизации берут кровь, получают сыворотку и определяют титр антител.

В. Для получения кроличьей антисыворотки к белкам сыворотки человека рекомендуется описанный ниже метод иммунизации, позволяющий приготовить, по-видимому, наилучшую иммунную сыворотку для выявления многих белковых компонентов, в том числе иммуноглобулинов. В этом методе совмещены две схемы иммунизации: по Мильгрому и по Проому.

Сначала кроликов иммунизируют по Мильгрому. Для этого из ушной вены животного берут 2 мл крови, смешивают с 0,5 мл 3,8%-ного раствора лимоннокислого натрия, осаждают эритроциты и трижды отмывают их пятью объемами физиологического раствора хлористого натрия. К осадку отмытых эритроцитов прибавляют два объема инактивированной сыворотки человека группы АВ и, периодически помешивая, инкубируют смесь в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем эритроциты вновь трижды отмывают, доводят объем суспензии физиологическим раствором до 2 мл и вводят в вену тому же самому кролику. Эти инъекции повторяют каждые 3 дня, пока титр антиглобулиновых антител не достигнет 1:1000—2000 в реакции пассивной гемагглютинации с эритроцитами Rh (D) +, сенсibilизированными неполными анти-D-антителами с титром 1:32.

Как только титр антиглобулиновых антител достигает указанной величины, иммунизацию продолжают по схеме Проома. Для этого белки человеческой сыворотки адсорбируют на алюминиево-калиевых квасцах; 25 мл стерильной сыворотки разбавляют 80 мл дистиллированной воды и к полученному раствору прибавляют 90 мл 10%-ного раствора алюминийско-калиевых квасцов. С помощью 5 н. NaOH подводят рН раствора до 6,5. Образовавшийся осадок собирают центрифугированием и, отбросив надосадочную жидкость, дважды промывают его 200 мл физиологического раствора, содержащего мертиолат (1:10 000). Конечный объем суспензии доводят до 100 мл физиологическим раствором и хранят при +4°C не более 14 дней. По 5 мл этой суспензии вводят животным внутримышечно в область бедра 2—3 раза с интервалом в 14 дней. На 9—10-й день после последней иммунизации у животных берут кровь.

За процессом иммунизации можно следить иммуноэлектрофоретически, исследуя образцы, получаемые во время очередной инъекции антигена.

2. СХЕМЫ ИММУНИЗАЦИИ С АДЬЮВАНТАМИ

А. Адсорбция антигена на гидроокиси алюминия: адсорбция белкового антигена на геле гидроокиси алюминия значительно увеличивает его иммуногенность.

В нашей лаборатории гидроокись алюминия используется при иммунизации кроликов для получения антисыворотки к сывороточным белкам человека (например, для иммуноэлектрофоретических исследований). Ниже описывается способ получения антисыворотки.

Приготовление антигена заключается в смешивании следующих компонентов: 6,25 мл сыворотки человека (берется смесь сывороток нескольких доноров), 12,5 мл 0,9%-ного раствора NaCl, 5,0 мл геля гидроокиси алюминия, 1,25 мл 5%-ного раствора фенола. 2,5 мл этой смеси вводят внутримышечно животным в два места раз в неделю в течение 6 нед. Через неделю после последней инъекции у кролика берут кровь и определяют титр антител. Если титр сыворотки еще не достиг необходимой величины или если с ее помощью нельзя выявить желаемого числа антигенных компонентов, еженедельные инъекции повторяют до получения нужного эффекта.

Б. Существенную помощь при получении антисыворотки оказывает адъювант Фрейнда [7]. Необходимое количество белкового антигена (например, 500 мг овальбумина) растворяют в 10 мл физиологического раствора хлористого натрия, содержащего 1% фенола. К раствору антигена добавляют 10 мл одного из имеющихся в продаже эмульгаторов, производных ланолина (аквафор фирмы Duke Lab., фальба фирмы Pfaltz and Bauer Inc. N. Y.; безводный ланолин), и смешивают их в гомогенизаторе Уоринга. К полученному гомогенату добавляют 20 мл жидкого парафина, содержащего 50 мг равномерно суспендированных лиофилизированных микобактерий туберкулеза, убитых нагреванием. После повторной гомогенизации 1 мл полученной смеси, подогретой перед инъекцией до 37°C, вводят животным внутримышечно или подкожно трижды с недельным интервалом.

В продаже имеются готовые препараты полного и неполного адъюванта Фрейнда. Весьма хорошо себя зарекомендовала следующая схема иммунизации белковыми антигенами. 0,1—1,0 мг антигена растворяют в 0,25—0,5 мл физиологического раствора хлористого натрия и гомогенизируют с равным объемом полного адъюванта Фрейнда. Эмульсию вводят внутримышечно в четыре места. Спустя 3—4 нед у животного берут кровь и определяют активность антисыворотки в иммуноэлектрофорезе. При необходимости эту процедуру повторяют. Если через 2—3 нед после повторной имму-

низации специфическая активность антисыворотки окажется недостаточной, то делают дополнительные еженедельные внутримышечные инъекции 5—10 мг белкового антигена без адьюванта до тех пор, пока титр антител не достигнет нужной величины.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. *Приготовление геля гидроокиси алюминия.* Растворы: а) 11,0 г сернокислого аммония растворяют в дистиллированной воде, доводят конечный объем раствора до 300 мл и подогревают до 63°C; б) 38,35 г алюминиево-калиевых квасцов растворяют в 500 мл дистиллированной воды и подогревают раствор до 58°C.

Раствор сернокислого аммония смешивают с раствором квасцов (1 : 2), с помощью NaOH доводят pH полученной смеси до 6,5, затем нагревают до 61°C и оставляют при этой температуре на 10 мин. Как только закончится образование и оседание хлопьев, смесь центрифугируют и осадок трижды отмывают дистиллированной водой, в которую добавлено несколько капель аммиака. Отмытый осадок суспендируют в дистиллированной воде до нужной концентрации.

2. После того как в ходе иммунизации активность сыворотки, которую измеряют, отбирая пробы, достигнет нужной величины, животным-продуцентам делают кровопускание для получения максимального количества сыворотки. Если иммунная сыворотка получена в нестерильных условиях, в нее рекомендуется добавить мертиолат в соотношении 1 : 5000. При хранении в холодильнике (по возможности в замороженном состоянии) активность полученных антисывороток может сохраняться в течение нескольких лет.

Если курс иммунизации животного-продуцента не закончился тотальным кровопусканием, то через некоторое время ему можно сделать повторную «напоминающую» инъекцию антигена в той же дозе и тем же способом, а через 7—9 дней можно взять кровь и получить иммунную сыворотку.

3. Иммунная сыворотка, используемая в реакциях преципитации, должна иметь титр антител не менее 1 : 10 000.

Б. АНАЛИЗ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ

1. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Принцип метода. При смешивании растворимого белкового антигена со специфической иммунной сывороткой наблюдается образование преципитата.

Область применения. Выявление специфических антител и выявление при помощи специфической иммунной сыворотки белковых антигенов, взятых в качестве иммунизирующего материала.

МЕТОДИКА

В зависимости от имеющегося в распоряжении количества иммунной сыворотки ее разливают в пробирки по 0,1—0,5 мл. В каждую пробирку вносят равный объем раствора антигена — в первую пробирку неразведенный, а в последующие с возрастающим разведением (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 и т. д.). После перемешивания растворов пробирки инкубируют в водяной бане при 37°C 60 мин. Если сыворотка достаточно активна, то уже на этом этапе появляются ясно различимые преципитаты. После инкубации пробирки оставляют до следующего дня в холодильнике. При использовании слабых иммунных сывороток преципитаты можно обнаружить после центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин.

Контроль I: к 0,1—0,5 мл 0,9%-ного раствора NaCl добавляют равное количество раствора антигена так же, как в опытной пробе.

Контроль II: к 0,1—0,5 мл иммунной сыворотки добавляют 0,9%-ный раствор NaCl в том же объеме, в каком добавляли антиген в опытной пробе.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Реакция считается положительной, если в пробирке образуется преципитат. В случае известной иммунной сыворотки это указывает на присутствие соответствующего белкового антигена; в случае известного белкового антигена — на присутствие специфических антител в исследуемой антисыворотке.

2. Реакция считается отрицательной, если преципитат не образовался. Это может означать, что : 1) в исследуемой системе отсутствует антиген, к которому специфична применяемая антисыворотка; 2) в антисыворотке отсутствуют антитела к данному антигену; 3) в системе имеется избыток антигена, растворяющего преципитат. Чтобы избежать ошибочной оценки реакции из-за растворения преципитата в избытке специфического антигена, следует к одному и тому же объему антисыворотки прибавлять раствор антигена с возрастающим разведением или постепенно уменьшать его количество.

3. В принципе для образования видимого преципитата достаточно, чтобы в реакции участвовало 0,1—0,5 мг азота антител. При меньшем количестве антител преципитат можно еще выявить, отцентрифугировав реакционную смесь. Однако если количество азота антител меньше 0,01 мг, то реакция преципитации не происходит.

4. Если в распоряжении исследователя имеется ограниченное количество иммунной сыворотки, то реакцию преципитации можно поставить следующим образом. В центрифужную пробирку вносят 0,1—0,5 мл этой сыворотки, затем к ней добавляют 0,01 мл раствора антигена, перемешивают и оставляют на 30 мин при 37°C. Если преципитат не образуется, к реакционной смеси добавляют еще 0,03 мл раствора антигена и продолжают инкубацию еще 30 мин. В ожидании появления преципитата можно и дальше повторять эту процедуру, добавляя возрастающие количества антигена (0,1; 0,3; 1,0 мл и т. д.).

5. Центрифугируя реакционную смесь при положительной реакции преципитации, можно удалить образовавшийся преципитат и определить, какой из двух компонентов системы, антиген или антитело, остался в надосадочной жидкости. Тем самым удастся выяснить, в избытке какого компонента проходила реакция. Для этого половину надосадочной жидкости смешивают с равным объемом иммунной сыворотки, а к другой половине добавляют возрастающие количества раствора антигена (см. предыдущий раздел). Образование преципитата в первом случае свидетельствует об избытке антигена, во втором — об избытке антител. Подобным образом можно определить оптимальное соотношение антиген — антитело для положительной реакции преципитации.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА ПРЕЦИПИТИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ ПО РАЗВЕДЕНИЮ АНТИГЕНА

Принцип метода. При внесении в специфическую иммунную сыворотку растворимого белкового антигена происходит реакция преципитации. Количество преципитирующих антител в неразведенной или в разведенной в 10 раз антисыворотке можно охарактеризовать тем наибольшим разведением антигена, которое еще способно вызвать реакцию преципитации с данной сывороткой; это разведение называется *титром преципитинов*.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление серийных разведений антигена.* В зависимости от того, сколько сыворотки имеется в распоряжении исследователя, готовят серию двукратных, четырехкратных или десятикратных разведений антигена. При подготовке серии двукратных разведений антигена в штатив помещают 16 вассермановских пробирок; в первую наливают 0,5 мл неразведенного антигена, а во все остальные — по 0,5 мл 0,9%-ного раствора NaCl. Во вторую пробирку вносят 0,5 мл неразведенного антигена и после перемешивания 0,5 мл смеси переносят пипеткой в третью пробирку.

Смешав содержимое третьей пробирки, 0,5 мл переносят в четвертую и т. д. до конца ряда. Из последней пробирки отбирают 0,5 мл и выбрасывают. Таким образом получается серия разведений раствора антигена от исходного до разведенного в соотношении 1 : 32 768. (Меняя аликвоты растворов антигена и хлористого натрия, можно подобным образом приготовить серии разведений другой кратности.)

2. *Добавление иммунной сыворотки.* В каждую пробирку с раствором разведенного антигена добавляют равные объемы неразведенной или разведенной в 10 раз иммунной сыворотки.

3. *Контрольные пробы.* Контроль I: 0,5 мл иммунной сыворотки смешивают с равным объемом 0,9%-ного раствора NaCl. Контроль II: 0,5 мл 0,9%-ного раствора NaCl смешивают с равным объемом раствора антигена.

4. *Инкубация и учет результатов реакции.* Перемешав растворы, пробирки инкубируют при 37°C в течение 60 мин, затем их переносят в холодильник и учитывают результаты реакции на следующий день. Титром преципитинов считается то наибольшее разведение антигена, при котором еще образуется преципитат с исследуемой иммунной сывороткой.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Иммунные сыворотки, которые готовят для иммунохимического анализа белков, должны преципитировать соответствующие белковые антигены, разведенные не менее чем в соотношении 1 : 10 000 — 50 000.

2. Недостаток данного метода заключается в том, что требуются относительно большие количества исследуемого материала. Если исследователь располагает небольшими количествами антигена или антисыворотки, можно уменьшить объемы компонентов системы до 0,2 мл или воспользоваться другим методом, требующим меньших количеств компонентов.

3. Для успешного проведения ряда иммунохимических исследований необходимо, чтобы реакция преципитации осуществлялась в так называемой *зоне эквивалентности*, т. е. при оптимальных количественных соотношениях антигенов и антител, вступающих в реакцию. С помощью метода разведений, описанного выше, эту зону можно определить следующим образом. Готовят ряд двукратных разведений иммунной сыворотки в объеме 0,2—0,5 мл и в каждую пробирку вносят равный объем раствора антигена в том разведении, при котором еще происходит реакция преципитации. Пробирки инкубируют при 37°C в течение 60 мин, оставляют на ночь в холодильнике и учитывают реакцию на следующий день.

При этом определяют наибольшее разведение иммунной сыворотки, при котором еще образуется преципитат со взятым по титру антигеном. Считается, что в этих условиях реакция преципитации протекает в зоне эквивалентности.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОНЫ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ РЕАКЦИИ АНТИГЕН—АНТИТЕЛО

Принцип метода. Определяют те количества антигена и иммунной сыворотки, которые без остатка вступают в реакцию преципитации после их перемешивания, так что надосадочная жидкость после отделения осадка не содержит ни антигена, ни антител.

Область применения. Предварительное определение зоны эквивалентности необходимо для постановки количественной реакции преципитации (см. стр. 125) и иммуноэлектрофореза (см. стр. 137).

МЕТОДИКА

Готовят серию двукратных разведений раствора антигена известной концентрации (см. стр. 121). 0,1 мл раствора антигена каждого разведения смешивают с 0,5 мл иммунной сыворотки. В зависимости от активности антисыворотку можно применять либо неразведенной, либо в разведении 1 : 2 или 1 : 4. Смесь инкубируют 60 мин при 37°C и оставляют до следующего дня в холодильнике. Образовавшийся преципитат осаждают центрифугированием при 1500 об/мин 10 мин и в надосадочной жидкости определяют оставшийся антиген или антитела, как описано на стр. 120. Проба, в которой надосадочная жидкость не содержит ни антигена, ни антител, позволяет обнаружить зону эквивалентности.

Для более точного выявления зоны эквивалентности следует надосадочную жидкость из пробирок, расположенных рядом с той, которая указывает на зону эквивалентности, дополнительно исследовать с более дробными разведениями антигена.

4. РЕАКЦИЯ КОЛЬЦЕПРЕЦИПИТАЦИИ (РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ НА ГРАНИЦЕ СЛОЕВ, СОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕН И АНТИТЕЛА)

Принцип метода. Если наложить раствор антигена на специфическую антисыворотку, то на границе раздела двух слоев происходит реакция преципитации.

Область применения. Определение титра антител в иммунных сыворотках.

ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

1. Стекланные (преципитационные) пробирки длиной 35 мм и диаметром 2,5 мм.
2. Капиллярные (пастеровские) пипетки.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление серийных разведений антигена* (см. стр. 121).
2. *Постановка реакции.* На дно преципитационных пробирок капиллярной пипеткой вносят по 0,04 мл исследуемой иммунной сыворотки. Затем, держа пробирки наклонно, в каждой из них капиллярной пипеткой насаивают на сыворотку примерно 0,04 мл антигена из серии соответствующих разведений.
3. *Инкубация и учет результатов реакции.* Пробирки оставляют в холодильнике и на следующий день учитывают результаты реакции.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. При положительной реакции на границе раздела между слоями антигена и иммунной сыворотки появляется беловатое опалесцирующее кольцо, видимое невооруженным глазом. В случае интенсивной реакции преципитации это кольцо появляется уже через несколько минут, и фрагменты преципитата могут осесть на дно пробирки.
2. Кольцо преципитата занимает в пробирке строго горизонтальное положение, не изменяя его даже, если пробирку осторожно наклонить. По этому признаку преципитат можно отличить от неспецифического осадка, положение которого при наклоне пробирки будет изменяться.
3. Кратность разведений антигена определяется той точностью, с которой должен быть определен титр антител; можно приготовить десяти-, пяти-, трех- и двукратные разведения антигена.
4. При учете результатов реакции удобно просматривать пробирки на темном фоне, так как в этом случае кольца преципитата лучше видны.
5. Как и в других методах титрования преципитинов, титром реакции кольцепреципитации считается то наибольшее разведение антигена, при котором еще образуется кольцо преципитата.
6. Основное преимущество этого метода титрования антител заключается в том, что для реакции требуется небольшое количество реагентов. Диффузия растворов антигена и антител происходит довольно медленно, поэтому в реакции кольцепреципитации в меньшей степени, чем в других реакциях, выражен растворяющий эффект избытка антигена.

7. К недостаткам реакции кольцепреципитации следует отнести меньшую воспроизводимость по сравнению с вышеописанными методами, а также то, что с ее помощью нельзя определить количественного соотношения антигена и антител.

5. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ ПО ХАЙДЕЛЬБЕРГЕРУ [12]

Принцип метода. Если реакция преципитации происходит в зоне эквивалентности, то, определив азот преципитата, можно вычислить соотношение реагирующих компонентов. Вычитая из количества азота преципитата известное количество азота антигена, можно вычислить количество азота антител в исследуемой иммунной сыворотке.

Область применения. Определение азота антител в исследуемых иммунных сыворотках с помощью раствора антигенов известной концентрации. Определение концентрации белковых антигенов при помощи антисывороток с известной концентрацией азота антител.

МЕТОДИКА

1. *Определение оптимального соотношения антиген — антитело.* Зону эквивалентности антиген — антитело определяют в предварительных экспериментах (см. стр. 123).

2. *Постановка реакции, инкубация.* Определив зону эквивалентности, в 5 центрифужных пробирок наливают по 1 мл исследуемой иммунной сыворотки и добавляют раствор антигена в возрастающих концентрациях. Концентрация добавляемого антигена должна быть известна из предварительных опытов. Антиген и иммунную сыворотку осторожно перемешивают, вращая каждую пробирку между ладонями, инкубируют 1 ч при 37°C и на 24 ч оставляют в холодильнике.

3. *Центрифугирование и отмывание преципитата.* После того как реакция преципитации закончится, образовавшийся преципитат осаждают центрифугированием при 2000 об/мин в течение 60 мин.

Надосадочную жидкость (I) осторожно сливают, следя за тем, чтобы в нее не попали фрагменты преципитата. Если нет уверенности в том, что преципитат достаточно хорошо осел, надосадочную жидкость следует не сливать, а отсасывать. После удаления надосадочной жидкости центрифужные пробирки переворачивают вверх дном и ставят вертикально на фильтровальную бумагу.

К осадку добавляют 0,5 мл охлажденного 0,9%-ного раствора NaCl и энергично встряхивают пробирку, суспендируя преципитат. Затем тем же раствором (2,5 мл) смывают частички преципитата со

стенок пробирки (общий объем пробы будет 3 мл). Суспендированный преципитат вновь центрифугируют при 2000 об/мин, надосадочную жидкость сливают, а отмывание повторяют еще раз.

4. *Растворение преципитата.* К дважды отмывому преципитату добавляют несколько капель дистиллированной воды и 1 каплю 0,5 М раствора NaOH. После растворения преципитата в полученном растворе определяют содержание азота одним из соответствующих методов.

5. *Определение зоны эквивалентности.* Чтобы определить, в какой из пяти пробирок реакция преципитации действительно проходила в зоне эквивалентности, в надосадочной жидкости каждой пробы (1) определяют избыток антигена или антител, добавляя соответственно иммунную сыворотку или раствор антигена (см. стр. 120).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Преципитация обычно максимальна в тех пробирках, надосадочная жидкость (1) которых содержит небольшой избыток антигена. Можно определить количество азота антител в исследуемой антисыворотке, если вычесть известное количество азота антигена из количества азота в преципитате такой пробы. Результаты обычно выражают количеством азота антител в 1 мл иммунной сыворотки.

2. Результаты количественной реакции преципитации можно выразить графически, построив кривую зависимости количества азота преципитата от количества добавляемого антигена. Полученную кривую можно разделить на три части. Первая часть кривой — зона избытка антител. В соответствующих пробирках комплексы антиген — антитело образуют преципитат, который осаждается центрифугированием, а в надосадочной жидкости можно обнаружить свободные молекулы антител. Вторая часть кривой (ее вершина) — зона эквивалентности. Надосадочная жидкость в соответствующих пробирках не содержит ни свободного антигена, ни свободных антител. Третья часть кривой — зона избытка антигена; надосадочная жидкость в соответствующих пробирках содержит несвязанные молекулы антигена. С увеличением количества добавляемого антигена количество азота преципитата начинает уменьшаться. Дальнейшее увеличение концентрации антигена может привести к еще большему растворению преципитата вплоть до полного перехода его в раствор.

3. Необходимые для постановки этой реакции количества антигена и антисыворотки зависят от чувствительности выбранного метода определения белка. Так, например, при использовании микрометода Кьельдаля в модификации Маркхема вполне достаточно, чтобы иммунная сыворотка содержала 75—125 мкг азота антител. При использовании биуретовой реакции требуется вдвое

большее содержание азота антител. В то же время, если белок определять спектрофотометрически, в реакции может участвовать половина указанного количества антител, а при определении методом Фолина — Чиокальтеу или нингидриновой реакцией достаточно одной трети этого количества. В соответствии с этим объем иммунной сыворотки в центрифужной пробирке может варьировать от 0,5 до 4,0 мл.

4. Во избежание денатурации белков рекомендуется использовать центрифугу с охлаждением.

В. АНАЛИЗ БЕЛКОВ МЕТОДАМИ ДИФФУЗИИ В ГЕЛЕ

1. МЕТОД ПРОСТОЙ ЛИНЕЙНОЙ ДИФФУЗИИ В ГЕЛЕ ПО УДЕНУ [18, 19]

Принцип метода. Растворимый антиген диффундирует в агаровом геле, содержащем иммунную сыворотку. В том участке геля, где возникает его относительный избыток, в агаре образуется полоса преципитации.

Область применения. Определение концентрации растворимых белковых антигенов. Определение минимального числа антигенных компонентов, выявляемых данной антисывороткой в смеси белков.

ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

1. Пробирки длиной 60—80 мм и диаметром 2—3 мм.
2. Капиллярные (пастеровские) пипетки.

МЕТОДИКА

1. *Очистка агара.* Для реакции следует использовать очищенный агар хорошего качества. Если агар не достаточно очищен, рекомендуется обработать его следующим образом.

30,0 г агара, обычно используемого для приготовления питательных сред, растворяют в 400 мл нейтральной дистиллированной воды, нагревая в кипящей водяной бане, и, как только агар растворится, выливают раствор в кювету. После охлаждения затвердевший агар разрезают на небольшие кубики, которые в течение 3 дней промывают проточной водопроводной водой, а в следующие 3 дня — нейтральной дистиллированной водой. Дистиллированную воду следует менять не реже двух раз в день. Отмытые кубики агара вновь расплавляют в конической колбе, нагревая на водяной бане, разливают по флаконам и хранят до использования в холодильнике.

2. *Приготовление агарового геля.* Перед использованием отмытого агара в нем определяют содержание сухого вещества. Для этого, тщательно взвесив чашку Петри, в нее наливают 10 мл расплавленного агара. После затвердения агар высушивают в сушильном шкафу при 100°C в течение примерно 12 ч. После охлаждения чашку Петри вновь взвешивают и вычисляют концентрацию агара в отмытом геле. (Если, например, чашка Петри до внесения 10 мл агара весила 50,0 г, а после высушивания в ней агара весит 50,5 г, то, следовательно, внесенный раствор агара имел концентрацию 5 %.) Зная эту величину, отмытый агар расплавляют и 0,9%-ным раствором NaCl доводят до нужной концентрации, прибавив в качестве консерванта 0,01 % мертиолата.

3. *Нанесение агара на внутреннюю поверхность пробирок.* Чтобы покрыть внутреннюю поверхность пробирок тонким слоем агара, их заполняют 0,1 %-ным расплавленным агаром с помощью капиллярной пипетки и сразу же после заполнения агар сливают. Агаровые пленки высушивают, поместив пробирки в эксикатор.

4. *Постановка реакции.* 0,6 %-ный агар, расплавленный в физиологическом растворе, охлаждают до температуры $46\text{--}48^{\circ}\text{C}$ и смешивают с равным объемом иммунной сыворотки, нагретой до этой же температуры. С помощью капиллярной пипетки расплавленную смесь агара и антисыворотки вносят в пробирки, покрытые изнутри сухой агаровой пленкой, избегая образования пузырьков воздуха. Столбик агара в пробирке должен иметь высоту около 4 см.

Когда агар затвердеет, на его поверхность с помощью капиллярной пипетки накладывают раствор антигена, заполняющий пробирку на высоту 2—3 см, заливают парафином и оставляют при комнатной температуре.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Через определенный промежуток времени антиген диффундирует в агар. В условиях относительного избытка антигена в агаре образуется полоса преципитации, которая медленно мигрирует от границы, разделяющей агар и раствор антигена, в нижние слои агара. Миграция полосы обусловлена диффузией антигена в агаровом геле, в результате которой постепенно увеличивается концентрация антигена между полосой преципитации и верхней границей агарового слоя, т. е. выше так называемого *фронта преципитации*. С увеличением концентрации антигена происходит не только продвижение фронта преципитации вниз, но также и растворение преципитата у верхнего края полосы.

2. Расстояние между фронтом преципитации и верхней границей агарового слоя (h) пропорционально квадратному корню

из величины, характеризующей промежуток времени от момента наложения раствора антигена до момента учета {преципитации (t)}. Эта зависимость позволяет рассчитать скорость миграции (k) фронта преципитации согласно следующему уравнению:

$$k = \frac{h}{\sqrt{t}}.$$

Это же уравнение позволяет, кроме того, провести количественный анализ растворов неизвестных антигенов. При низком соотношении антиген — антитело концентрации антител a и антигена g связаны следующей зависимостью:

$$\frac{h}{\sqrt{t}} = \gamma \lg \frac{g}{g_0} \quad \text{и} \quad \frac{h}{\sqrt{t}} = \alpha \lg \frac{a}{a_0},$$

где g_0 и a_0 — значения g и a при $\frac{h}{\sqrt{t}} = 0$, а γ и α представляют собой коэффициенты, соответственно большие и меньшие нуля. Таким образом, скорость миграции фронта преципитации k прямо пропорциональна логарифму концентрации антигена g и обратно пропорциональна логарифму концентрации антител a .

Величина k возрастает с увеличением температуры и уменьшается с увеличением концентрации агара. При резких изменениях температуры могут появляться неспецифические преципитаты, которые, однако, не мигрируют.

Величину h выражают обычно в мм и измеряют ежедневно.

2. МЕТОД ДВОЙНОЙ (ОДНОМЕРНОЙ) ЛИНЕЙНОЙ ДИФФУЗИИ В ГЕЛЕ [15, 20]

Принцип метода. Раствор белкового антигена и иммунная сыворотка диффундируют в агаровом геле навстречу друг другу и образуют преципитат.

Область применения. Определение минимального числа компонентов в белковых смесях.

ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

1. Пробирки длиной 60—80 мм и внутренним диаметром 2—3 мм.
2. Капиллярные (пастеровские) пипетки.

МЕТОДИКА

1. Очистка агара и приготовление геля (см. стр. 127).
2. Нанесение агаровой пленки на внутреннюю поверхность пробирок (см. стр. 128).

3. *Постановка реакции.* При помощи капиллярной пипетки смесь расплавленного агара и иммунной сыворотки наливают на высоту ~20 мм в пробирки, покрытые изнутри агаровой пленкой.

Приготовление смеси агара с иммунной сывороткой. Расплавленный в физиологическом растворе 0,6%-ный агар охлаждают до температуры 46—48°C и смешивают с равным объемом подогретой до этой же температуры иммунной сыворотки.

После того как внесенная в пробирки смесь агара и антисыворотки затвердеет, сверху наносят 0,3%-ный расплавленный агар на высоту 8—10 мм. Как только затвердеет и этот слой, на него наслаивают смесь расплавленного агара с раствором антигена на высоту 20 мм.

Приготовление смеси агара с раствором антигена. Расплавленный 0,6%-ный агар при температуре 46—48°C смешивают с равным объемом раствора антигена.

Пробирки, заполненные тремя слоями агара, заливают парафином и оставляют при комнатной температуре.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. При использовании антисыворотки с высоким титром уже через несколько часов после постановки реакции в промежуточном слое агара появляется одна или несколько полос преципитации. Если используемая антисыворотка имеет низкий титр антител или применяется в большом разведении, то образование полос преципитации происходит через несколько дней.

2. Полосы преципитации, как правило, располагаются в том участке геля, в котором создается оптимальное соотношение концентраций антигена и антител. При относительно большем разведении антисыворотки реакция преципитации происходит вблизи границы агара, содержащего иммунную сыворотку. Если же используются относительно разбавленные растворы антигена, реакция преципитации наблюдается ближе к границе агарового слоя, содержащего антиген. В соответствии с этим располагаются полосы преципитации.

3. Положение полос преципитации можно охарактеризовать величиной p , которая выражает в процентах отношение расстояния между нижней границей агарового слоя, содержащего антиген, и полосой преципитации ко всей длине промежуточного слоя агара, который первоначально не содержал ни антигена, ни антител.

4. Метод одномерной диффузии в агаре удобен главным образом для качественного анализа. По числу образующихся полос преципитации можно судить о минимальном числе разных антигенных компонентов, которые реагируют с антителами соответствующей специфичности в данной системе.

3. МЕТОД ДВУМЕРНОЙ ДВОЙНОЙ ДИФФУЗИИ В ГЕЛЕ ПО УХТЕРЛОНИ [17]

Принцип метода. Растворы антигена и иммунной сыворотки диффундируют навстречу друг другу в плоском слое агарового геля. В месте встречи антигена и антитела образуется преципитат.

Область применения. Метод позволяет непосредственно сравнивать различные белки (антигены) или специфические иммунные сыворотки. Он используется для выявления определенных белков в белковых смесях, для определения антигенной идентичности, общности или различий между белками.

ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

1. Чашки Петри.
2. Металлические кубики с гранью размером 10 мм.
3. Набор штампов для вырезания лунок в агаровом геле.

МЕТОДИКА

1. *Очистка агара и приготовление геля* (см. стр. 127).

2. *Приготовление агаровой пластинки.* Обычно реакцию ставят в плоском слое агарового геля, затвердевшего на дне чашки Петри. Сначала внутреннюю поверхность чашки Петри покрывают агаровой пленкой. Для этого ее наполняют 0,1 %-ным расплавленным агаром, затем сразу же агар выливают, а чашки переносят в эксикатор для полного высушивания. Другой вариант подобной процедуры состоит в том, что покрывают дно чашки Петри слоем 1 %-ного расплавленного агара толщиной примерно 1 мм. В качестве консерванта в агар следует добавить мертиолат.

В подготовленные чашки Петри наливают расплавленный в физиологическом растворе 1 %-ный агар, содержащий 0,1 % мертиолат, таким образом, чтобы получился слой толщиной 3—4 мм. В приготовленном слое агарового геля делают лунки для внесения исследуемых образцов.

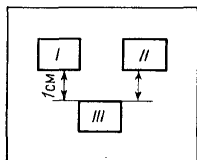
3. *Приготовление лунок.* Лунки в слое агарового геля для внесения исследуемых образцов можно сделать двумя способами:

а) В чашку Петри, покрытую изнутри пленкой агара, помещают три металлических кубика с гранью 10 мм, расставив их на расстоянии 1 см один от другого, как показано на фиг. 23. Затем в чашку наливают расплавленный агар, образующий слой толщиной 3—6 мм, и помещают ее в холодильник. После затвердения агара и удаления металлических кубиков в слое агарового геля остаются лунки, точно соответствующие форме и размерам кубиков.

б) Для приготовления лунок цилиндрической формы применяют специальные штампы или стеклянные трубки соответствующего

диаметра. Осторожно надавливая, их вертикально погружают в агаровый гель в нужном месте, стараясь не повредить соседние участки геля. Вырезав контуры лунок, штампы или стеклянные трубки извлекают, а вырезанные столбики агара удаляют, отсасывая их при слабом вакууме иглой большого диаметра.

4. *Внесение исследуемых образцов, учет реакции преципитации.* Исследуемый материал (растворы антигенов, иммунные сы-



Фиг. 23. Схема размещения исследуемых образцов в агаровом геле при постановке реакции преципитации по Ухтерлони [17] (подробное описание см. в тексте).

воротки) заливают в приготовленные лунки в агаровой пластинке.

Если необходимо провести сравнение двух белковых растворов или двух смесей белков, их вносят в две верхние лунки (I и II на фиг. 23), а специфическую иммунную сыворотку — в нижнюю (III).

После внесения образцов в агар следует обеспечить достаточную влажность в чашке, чтобы предотвратить его высыхание. Легче всего это сделать, поместив отрезок увлажненной фильтровальной бумаги на внутреннюю поверхность крышки, закрывающей чашку Петри.

Чашки с агаром можно оставить при комнатной температуре или перенести в холодильник. Их следует ежедневно просматривать, отмечая появление полос преципитации. В зависимости от условий опыта срок наблюдения может ограничиться сутками или же продлиться несколько дней, а то и недель.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Внесенные образцы диффундируют в геле равномерно по всем направлениям, и в тех участках геля между лунками, где возникает оптимальное соотношение концентраций антигена и антител, образуется полоса преципитации.

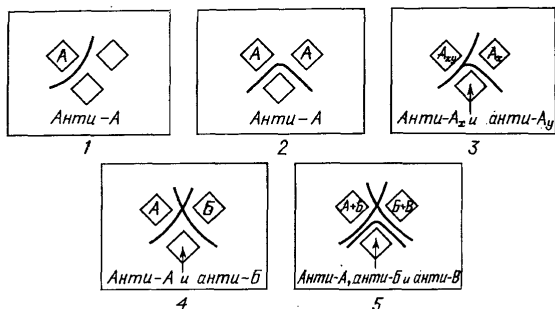
2. Оценка результатов:

а) *Легкое искривление преципитационной полосы между лунками* наблюдается в том случае, если иммунная сыворотка, заполняющая какую-либо лунку, содержит антитела (анти-А) к антигену (А), заполняющему одну из двух других лунок (фиг. 24, I).

б) *Полосы преципитации переходят одна в другую*, если в двух верхних лунках содержатся одинаковые белковые антигены (А),

а диффундирующая из нижней лунки антисыворотка содержит специфические (анти-А) антитела. Эта картина демонстрирует идентичность антигенов (фиг. 24,2).

в) Частичное слияние полос преципитации (образование шпоры) происходит в том случае, если образцы, заполняющие две верхние лунки, состоят из двух антигенных компонентов, один из которых является общим (A_x и A_y), а иммунная сыворотка содержит анти-



Фиг. 24. Оценка результатов реакции двумерной двойной диффузии в геле (подробное описание см. в тексте).

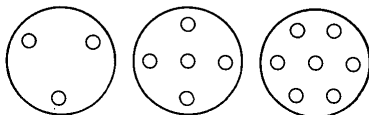
тела, специфичные к обоим антигенным компонентам (анти- A_x и анти- A_y). Это картина антигенной общности (фиг. 24,3). Форма и длина шпоры, образующейся в месте частичного слияния полос преципитации, зависят от степени антигенной общности исследуемых образцов. При тесной близости антигенов, т. е. если они имеют много идентичных детерминант, образуется короткая и прилегающая к сливающимся полосам шпора. Если сравниваемые антигены имеют мало идентичных детерминантных групп, то образуется длинная шпора, круто отходящая от сливающихся полос преципитации.

г) Полосы преципитации пересекаются, если обе верхние лунки заполнены растворами разных антигенов (антигенами А и В), а в третьей лунке находится иммунная сыворотка, содержащая антитела к обоим антигенам (анти-А и анти-В). Это картина различия антигенов (фиг. 24, 4).

д) Если верхние лунки содержат две разные смеси антигенов ($A + B$ и $B + V$), а иммунная сыворотка, заполняющая третью лунку, содержит антитела к каждому антигенному компоненту этих смесей (анти-А, анти-В и анти-В), образуется несколько полос пре-

ципитации; при этом можно наблюдать картину как идентичности, так и различия антигенов (фиг. 24,5).

е) Закономерности, о которых сообщается в пунктах применений а—д, справедливы лишь для равновесных систем с примерно равными концентрациями антигенов в разных лунках. При значительных различиях этих концентраций, т. е. в неуравновешенных



Фиг. 25. Схемы расположения лунок в агаровом геле.

системах, происходит асимметричное слияние полос преципитации; преципитат образуется дальше от лунки, содержащей более концентрированный раствор антигена, и ближе к лунке, наполненной менее концентрированным раствором антигена. При слишком больших различиях в концентрациях антигенов могут вообще образоваться двойные полосы преципитации или ложные шпоры. В отличие от истинных шпор, указывающих на частичное антигенное сходство, ложные шпоры не становятся более заметными в ходе инкубации, а, наоборот, постепенно теряют четкость и в конце концов исчезают.

3. Число полос преципитации, появляющихся в агаре при использовании этого метода, соответствует минимальному числу отдельных систем антиген — антитело, принимающих участие в реакции.

4. Расположение и кривизна полос преципитации зависят также от молекулярных весов реагирующих белков. Если молекулярный вес антигена меньше молекулярного веса антител, то полоса преципитации изгибается в сторону лунки, заполненной иммунной сывороткой. Если же молекулярный вес антигена больше молекулярного веса антител, то полоса преципитации сдвигается и изгибается в сторону лунки, заполненной антигеном.

5. При работе с низкоконцентрированными растворами антигена случается, что однократного заполнения лунки недостаточно для появления полосы преципитации, но повторно внести раствор антигена можно только после того, как лунка полностью опустошится. Следует помнить, что повторное заполнение может стать причиной образования двойной полосы преципитации.

6. В зависимости от количества анализируемых образцов число и схема расположения лунок в агаровой пластинке могут варьировать. На фиг. 25 представлено несколько часто используемых схем

расположения лунок. Лунки в агаровом геле можно сделать так, как описано выше (стр. 131), или с помощью специального приспособления.

7. Предварительный анализ исследуемых образцов можно легко и быстро провести в слое агара на стеклянной пластинке, разместив лунки на расстоянии 3—5 мм одна от другой в два параллельных ряда. Благодаря небольшому расстоянию между лунками, заполненными антигеном и иммунной сывороткой, полосы преципитации должны появляться весьма быстро. Подобным образом можно также проводить предварительное титрование растворов антигена или иммунной сыворотки, заполнив ряды лунок реагентами в соответствующих разведениях.

Другой способ состоит в том, что в слое агара на пластинке вырезают полоску шириной 1 мм на расстоянии 3—5 мм от ряда лунок; в образовавшийся желобок вносят иммунную сыворотку, а в лунки — раствор антигена.

8. Результаты реакции можно регистрировать фотографированием либо нативного препарата, либо окрашенных полос преципитации.

А. Непосредственная фотопечать с агаровой пластинки. После образования полос преципитации поверхность агарового геля промывают дистиллированной водой и помещают препарат, подобно негативной фотопластинке, в фотоувеличитель. Далее поступают точно так же, как при обычной фотопечати. При помощи объектива фотоувеличителя полосы преципитации фокусируют на светочувствительной бумаге. Рекомендуется печатать на контрастной фотобумаге и использовать контрастный проявитель.

Б. Окрашивание полос преципитации. Окрашивание агаровых пластинок не только делает полосы преципитации более заметными, но и повышает точность анализа за счет дополнения его специфическими цветными реакциями. Специальные методы окрашивания позволяют, кроме того, более подробно изучать белки и липопroteиды.

а) Подготовка агаровой пластинки для окрашивания. После образования полос преципитации производят элюирование из агарового геля тех белков, которые не участвовали в реакции преципитации. Для этого агаровую пластинку заливают 0,9%-ным раствором NaCl и проводят элюирование в течение 48 ч, 2—3 раза в день меняя элюирующую жидкость.

После элюирования агаровый гель сверху покрывают листом фильтровальной бумаги соответствующего размера, смоченным дистиллированной водой, и высушивают в термостате при 37°C. После полного высушивания агаровой пластинки покрывающую ее фильтровальную бумагу отклеивают, смочив несколькими каплями дистиллированной воды, и затем окрашивают сухую пленку агара в той же чашке Петри, в которой была поставлена реакция.

б) *Окрашивание белка амидовым черным. Окрашивающий раствор:* 0,1 г амидового черного 10В растворяют в 100 мл смеси уксусная кислота — метанол (1 : 9).

Отмывающий раствор: смесь уксусная кислота—метанол (1 : 9).

Перед окрашиванием на высушенную агаровую пластинку наливают 10%-ную уксусную кислоту и оставляют ее на 10 мин. Затем уксусную кислоту сливают и на 60 мин заливают препарат раствором амидового черного. После этого краситель сливают, а избыток его удаляют отмывающим раствором, меняя этот раствор каждые 15 мин, пока он не будет оставаться бесцветным.

в) *Окрашивание белков кислым фуксином. Окрашивающий раствор:* 2,0 г кислого фуксина растворяют в 500 мл метанола, добавляют 400 мл дистиллированной воды и 100 мл уксусной кислоты.

Дифференцирующий раствор: 500 мл метанола смешивают с 400 мл дистиллированной воды и 100 мл уксусной кислоты.

Отмывающий раствор: 10%-ная уксусная кислота.

Перед окрашиванием агаровые пластинки обрабатывают 10 мин 10%-ной уксусной кислотой.

После 30 мин окрашивания окрашивающий раствор сливают и агаровую пластинку заливают дифференцирующим раствором. Затем препарат обрабатывают отмывающим раствором, меняя его каждые 15 мин, пока не прекратится элюирование красителя.

г) *Окрашивание белков азокармином. Окрашивающий раствор:* 0,5%-ный раствор азокармина в смеси метанол—уксусная кислота (9 : 1).

Отмывающий раствор: смесь метанол—уксусная кислота (9 : 1).

Время окрашивания: 60 мин. При отмывании следует менять отмывающий раствор каждые 15 мин.

д) *Окрашивание белков пунцовым S. Окрашивающий раствор:* 0,15%-ный раствор пунцового S в 3%-ной трихлоруксусной кислоте.

Отмывающий раствор: 5%-ный раствор уксусной кислоты.

Время окрашивания: 60 мин. При отмывании следует менять отмывающий раствор каждые 15 мин.

е) *Окрашивание липопротеидов суданом черным. Основной раствор красителя:* 500 мг судана черного ВВ растворяют в 500 мл метанола. До использования основной раствор красителя следует не менее недели выдерживать в темном месте.

Окрашивающий раствор: 100 мл основного раствора красителя смешивают со 180 мл метанола и 120 мл дистиллированной воды. Перед окрашиванием раствор фильтруют через бумажный фильтр. После 60 мин окрашивания пробы отмывают водопроводной водой.

ж) *Окрашивание липопротеидов жировым красным. Окрашивающий раствор:* 0,5%-ный раствор жирового красного в 50%-ном этаноле.

Отмывающий раствор: 50%-ный этанол.

Время окрашивания: 2 ч. Отмывающий раствор следует менять каждые 15 мин.

4. ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Принцип метода. Иммуноэлектрофорез представляет собой комбинацию электрофоретического разделения белков с двойной диффузией и иммунопреципитацией в геле. Вслед за электрофоретическим разделением белков в агаровом геле навстречу полученным фракциям диффундирует специфическая иммунная сыворотка. Этот метод позволяет характеризовать белки не только по скорости миграции в электрическом поле, но и по антигенным свойствам.

Область применения. С помощью иммуноэлектрофореза производится идентификация компонентов белковых смесей, прежде всего сыворотки крови. Он весьма полезен при диагностике парпротеинемий и иммунодефицитных диспротеинемий. Этим методом осуществляется контроль чистоты белковых препаратов (определение примесей), а также анализ белков из тканей и жидкостей организма.

Наибольшее распространение получили два варианта этого метода: 1) макрометод Грабара — Вильямса [8, 9] и 2) микрометод в модификации Шейдигера [21], популярность которого объясняется быстротой осуществления и возможностью анализа малых количеств материала.

МАКРОМЕТОД ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПО ГРАБАРУ И ВИЛЬЯМСУ [8, 9]

ПРИБОРЫ

1. *Источник тока.* Необходим источник, дающий ток до 100 мА при стабилизированном напряжении 100—150 В.

2. *Прибор для электрофореза.* Прибор состоит из двух плексигласовых ванн размером 400 × 40 × 70 мм, в которые вмонтированы платиновые электроды длиной 400 мм и диаметром 0,5—0,8 мм. В торцевой части каждой ванны имеются выходные отверстия, соединенные резиновым шлангом. В ванны электрофоретического прибора заливают по 1 л буферного раствора. Во время электрофореза следует обеспечить постоянный поток буферного раствора через прибор. Для этого выше уровня ванн помещают бутылку емкостью 4—5 л, из которой буферный раствор поступает в ванны, вытекая затем через выходные отверстия в торцевой части.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление буферного раствора.* Иммуноэлектрофорез белков проводят обычно в буферном растворе Михаэлиса, имеющем рН 8,2 и ионную силу 0,05.

Буферный раствор Михаэлиса готовят следующим образом: 47,6 г диэтилбарбитулата натрия растворяют в 3000 мл дистиллированной воды, имеющей рН 7, и подкисляют сначала примерно до рН 8,4 65 мл 1 н. HCl, а затем осторожно до рН 8,2. После этого добавляют дистиллированную воду до конечного объема 4265 мл. Если необходимо получить буферный раствор меньшей ионной силы, производят дальнейшее разбавление.

2. *Приготовление агаровой пластинки.* 1,5%-ный агаровый гель готовят на указанном выше буферном растворе (очистка агара и приготовление геля описаны на стр. 127).

Обычно иммуноэлектрофорез проводят в слое агарового геля на стеклянных пластинках размером 180 × 130 мм, которые следует перед опытом тщательно вымыть, обезжирить, высушить и расположить строго горизонтально; любое отклонение пластинки от горизонтального уровня приводит к неравномерности толщины агарового геля. Рекомендуется применять следующий прием: стеклянную кювету соответствующего размера заполняют 5%-ным расплавленным агаром; после его затвердения образуется горизонтальная поверхность, на которую и помещают стеклянную пластинку. Для того чтобы положение пластинки всегда было строго горизонтальным, после затвердения агара кювету не следует сдвигать с места.

На оба края стеклянной пластинки накладывают полоски смоченной буферным раствором фильтровальной бумаги шириной 40 мм так, чтобы они на 30 мм выступали за край стекла.

Затем на поверхность стекла на расстоянии 31 мм одна от другой параллельно кладут стеклянные палочки или трубки диаметром 5 мм, на месте которых после затвердения агара образуются канавки для внесения антисывороток.

Расплавив 250—300 мл агара, его наливают на подготовленную стеклянную пластинку с полосками фильтровальной бумаги таким образом, чтобы образовался слой геля толщиной 3—4 мм. Следует наносить агар аккуратно, избегая появления пузырьков воздуха. После затвердения агара двумя пинцетами удаляют стеклянные палочки и по обе стороны каждой канавки на расстоянии 8 мм от нее вырезают лунки для внесения исследуемых образцов. Лунки размером 3 × 15 мм вырезают при помощи скальпеля, лезвия или специального инструмента из стекла или металла. Вырезанные столбики агарового геля осторожно извлекают из лунок, поддев снизу или отсасывая их иглой большого диаметра (фиг. 26).

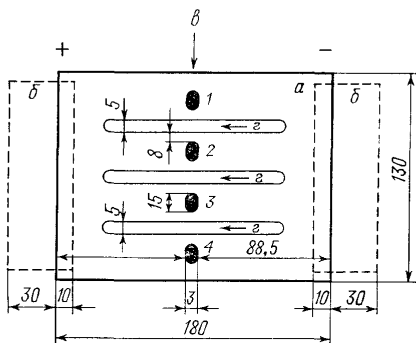
Затем агаровый гель обрезают по контуру стеклянной пластинки и полосок фильтровальной бумаги так, чтобы покрытые гелем

полоски можно было отогнуть книзу под прямым углом к плоскости пластинки.

Готовую агаровую пластинку закрепляют в приборе для электрофореза и покрытые гелем фитили фильтровальной бумаги погружают в буферный раствор, заполняющий ванны.

При помощи расплавленного агара восстанавливают целостность геля в местах его случайных повреждений, чтобы обеспечить одинаковую электропроводность всех участков.

3. *Внесение исследуемого образца.* Раствор, содержащий примерно 15 мг исследуемого белка (например, при исследовании сыворо-



Фиг. 26. Приготовление агаровой пластинки для иммуноэлектрофореза (макрометод).

a — слой агарового геля; b — полоски фильтровальной бумаги; v — лунки для исследуемых образцов (1, 2, 3, 4); e — канавки для иммунной сыворотки. (Размеры даны в мм.)

точных белков — 0,2 мл сыворотки крови), подогревают до 40°C и смешивают с 0,8 мл 3%-ного расплавленного агара, приготовленного на дистиллированной воде и охлажденного до 40°C . Полученную смесь вносят в лунку для исследуемого образца на агаровой пластинке. Оставшийся свободный объем лунки заполняют 1,5%-ным агаровым гелем в буферном растворе. При заполнении лунки следует избегать образования пузырьков воздуха.

4. *Электрофорез.* При напряжении 120 В электрофоретическое разделение белков сыворотки крови продолжается 4—5 ч. Оптимальный градиент напряжения 3—6 В/см. В этих условиях можно проводить электрофорез без специального охлаждения и в то же время не опасаться высыхания геля. При увеличении силы тока происходит падение напряжения, поэтому необходимо несколько раз во время сеанса электрофореза проверять напряжение в цепи.

5. *Внесение антител.* Во избежание неудачных опытов предварительно следует определить то оптимальное разведение иммунной сыворотки, при котором наблюдается наиболее четкая реакция преципитации с исследуемым антигеном (в данном случае с белками сыворотки крови).

По окончании электрофореза фитили из фильтровальной бумаги удаляют, а канавки в агаровом геле заполняют иммунной сывороткой, соответствующим образом разведенной физиологическим раствором. (Для заполнения канавки требуется около 1 мл сыворотки.)

После этого агаровую пластинку помещают во влажную камеру и оставляют до образования полос преципитации, которые появляются в геле через 2—5 дней.

6. *Регистрация результатов иммуноэлектрофореза.* Полосы преципитации можно зарегистрировать фотопечатью непосредственно с нативных препаратов (см. стр. 135) либо фотографированием после соответствующего окрашивания (см. стр. 135).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. После каждого сеанса электрофореза рекомендуется менять полюса электродов.

2. Буферный раствор Михаэлиса очень удобен для иммуноэлектрофоретического анализа белков сыворотки крови. Однако можно использовать и другие буферные растворы. В этих случаях, разумеется, следует готовить агаровый гель на том же буферном растворе, в котором проводится электрофорез.

МИКРОИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПО ШЕЙДИГЕРУ [21]

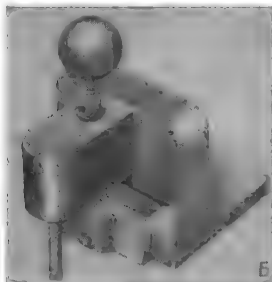
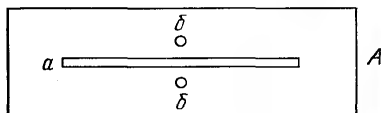
Приборы. 1. *Источник тока* (см. стр. 46).

2. *Прибор для электрофореза.* Прибор состоит из двух плексигласовых ванн размером $250 \times 100 \times 35$ мм, разделенных перегородкой на два отсека. В наружный отсек каждой ванны вмонтирован платиновый проволочный электрод диаметром 0,5—0,8 мм. Проводниками тока между отсеками служат полоски фильтровальной бумаги, смоченные в буферном растворе и погруженные в него по обе стороны от перегородки.

Между двумя буферными ваннами располагается камера для закрепления агаровых пластинок, также изготовленная из плексигласа. По ее верхнему краю с двух сторон внутри есть выступ шириной 2 мм, на который укладывают предметные стекла с агаровым гелем. Расстояние между краями выступа составляет 76 мм. Камера для агаровых пластинок закрывается плексигласовой крышкой, которая защищает агар от высыхания во время электрофореза. В каждый отсек ванны наливают по 150 мл буферного

раствора, который рекомендуется менять перед каждым опытом.

3. *Приспособление для вырезания лунок и канавок в агаровом геле.* При постановке микроиммуноэлектрофореза по Шейдигеру лунки для внесения исследуемых образцов и канавку для антисыворотки вырезают в агаровом геле с помощью специального приспособления. На фиг. 27, А представлена схема размещения лунок и канавки. Для вырезания канавки (а) в приспособлении (фиг. 27, Б) на рас-



Фиг. 27.

А. Схема расположения лунок для внесения исследуемых образцов (б) и канавки, из которой диффундирует иммунная сыворотка (а). Б. Приспособление для вырезания лунок и канавки.

стоянии 1 мм друг от друга укреплены два стальных лезвия, имеющих размер $5 \times 45 \times 0,08$ мм. Для вырезания лунок (б) на расстоянии 3 мм по обе стороны от внешней поверхности лезвий в приспособлении укреплены два отрезка иглы для подкожных инъекций, также имеющих высоту 5 мм. Эти отрезки игл закреплены не точно по центру штампа, а сдвинуты от него на 5 мм. Предметное стекло, покрытое слоем агарового геля, помещают под штамп приспособления, нажимают закрепленную на пружине рукоятку и, погрузив лезвия с иглами в гель, отмечают контуры канавки и лунок. Отсосав через отрезок иглы соответствующего размера кусочки агарового геля из лунок, в них вносят исследуемые образцы. После этого проводят электрофорез и, только закончив его, удаляют гель из канавки для внесения антисыворотки.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление буферного раствора.* Микроиммуноэлектрофорез обычно проводят в буферном растворе Михаэлиса, имеющем рН 8,2 и ионную силу 0,1 р.

Основной раствор: 194,2 г уксуснокислого натрия и 294,2 г вероната растворяют в 10 л дистиллированной воды.

При разведении основного раствора дистиллированной водой (8 : 9,6) и подведении 0,1 н. HCl pH до 8,2 получается буферный раствор с ионной силой 0,15 μ . Чтобы получить буферный раствор с ионной силой 0,1 μ , его следует развести дистиллированной водой в 1,5 раза.

2. *Подготовка предметных стекол.* Стекла, на которые наносят слой агарового геля, должны быть тщательно вымыты и обезжирены. Их следует мыть серной кислотой, содержащей бихромат калия, затем отмыть от кислоты проточной водопроводной и дистиллированной водой и хранить в этаноле. Перед использованием предметные стекла вытирают насухо, следя за тем, чтобы на поверхности не осталось никаких соринков.

3. *Приготовление слоя агарового геля.* Сухие предметные стекла помещают на горизонтальную поверхность (см. стр. 138) и с помощью пипетки с достаточно широким выходным отверстием наливают на поверхность каждого стекла 2 мл 1,5%-ного расплавленного агара, приготовленного на буферном растворе (об очистке агара и приготовлении геля см. на стр. 127). Необходимо добиться того, чтобы слой агарового геля был равномерным, покрывал всю поверхность стекла и не содержал пузырьков воздуха. Как только агар затвердеет, пластинки переносят во влажную камеру и хранят в холодильнике. Чаще всего агаровые пластинки готовят за 24 ч до постановки опыта.

Разметку лунок для образцов и канавки для антисыворотки следует делать непосредственно перед электрофорезом, как описано на стр. 141.

4. *Внесение исследуемого образца.* Раствор исследуемых белков, например сыворотку крови, вносят капиллярной пипеткой в лунку для исследуемых образцов, заполняя ее до края. Для электрофореза достаточно 0,001 мл раствора.

5. *Электрофорез.* После внесения исследуемых образцов агаровые пластинки помещают в камеру прибора для электрофореза. Контакт агарового геля с буферными ваннами прибора осуществляется с помощью полосок фильтровальной бумаги, смоченных буферным раствором. Бумажные фитили должны примерно на 15 мм покрывать гель на обоих концах агаровой пластинки.

Камеру с агаровыми пластинками закрывают крышкой и включают ток. Если напряжение, измеренное на краях агаровой пластинки, достигает 45 В, то электрофоретическое разделение белков закончится уже через 45—60 мин.

6. *Внесение иммунной сыворотки.* По окончании электрофореза ранее размеченную канавку освобождают от агарового геля и при помощи капиллярной пипетки или туберкулинового шприца заполняют специфической иммунной сывороткой (рекомендуется за-

ранее определить ее оптимальное разведение). Для заполнения канавки требуется примерно 0,05 мл иммунной сыворотки. Диффузия происходит во влажной камере при комнатной температуре в течение 16—24 ч.

7. *Регистрация результатов микроиммуноэлектрофореза.* Полосы преципитации можно зарегистрировать фотопечатью прямо с нативного препарата (см. стр. 135) или фотографированием после окрашивания (см. стр. 135).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Хорошо себя зарекомендовал прибор для электрофореза в агаровом геле фирмы Labor Műszeripari Művek, (Венгрия), тип Labor 59952. В центральной камере этого прибора можно одновременно проводить электрофорез на десяти агаровых пластинках. Прибор продается в комплекте с нивелируемым столиком (который позволяет приготовить равномерный слой агара), кюветами для окрашивания и вкладышами к ним, а также с приспособлением для штампования лунок и канавок в геле и микропипеткой. Прибор не сложен в обращении и с равным успехом может использоваться для электрофореза и иммуноэлектрофореза.

2. При отсутствии специального приспособления для штампования лунок и канавок в агаровом геле можно сделать простой самодельный штамп, укрепив в корковой пробке два лезвия бритвы и пару инъекционных игл (отпилив их острые концы) по размерам, данным на стр. 141.

3. Проще всего спилить острые концы инъекционных игл, вставив мандрен в иглу и обработав конец на вращающемся шлифовальном камне.

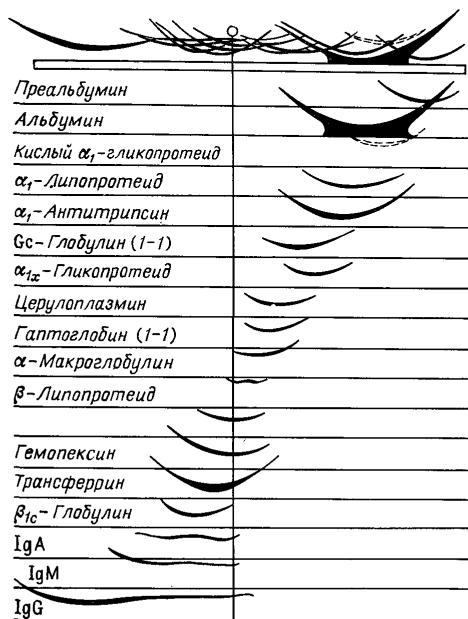
4. За процессом электрофоретического разделения сывороточных белков легко следить, окрасив сыворотку крови конго красным. Краситель связывается с альбумином и мигрирует вместе с ним. Следует отметить, что в результате окрашивания скорость миграции альбумина несколько увеличивается.

5. Если концентрация исследуемой смеси белков относительно мала (ниже 3%), рекомендуется увеличить объем лунки для внесения образца и залить в нее большее количество материала. Проще всего лунки большого размера можно сделать с помощью подходящих стеклянных трубок диаметром 2—4 мм.

6. Делая с помощью штампа на одной агаровой пластинке две лунки для внесения образца, мы получаем возможность одновременно анализировать два разных белка или две разных белковых смеси и сопоставлять их иммуноэлектрофоретические характеристики. Это имеет особое значение при анализе белков сыворотки крови, при котором в одну из лунок помещают исследуемую сыворотку, а в другую — нормальную сыворотку. В этих условиях

легче оценить иммуноэлектрофоретические особенности исследуемой сыворотки. Такой подход весьма целесообразен в том случае, когда необходимо определить, содержит ли исследуемая смесь определенный белок. (Например, содержит ли исследуемый тканевой экстракт белки сыворотки крови или какие компоненты сыворотки содержатся в исследуемом препарате белков, выделенном из мочи.)

7. Иммуноэлектрофоретическая характеристика белков сыворотки. Иммуноэлектрофорез применяется для анализа белков сыворотки крови чаще других методов. Его популярность объясняется тем, что, исследуя очень небольшое количество сыворотки, можно охарактеризовать 15—20 белковых фракций вместо 5, доступных для анализа при зональном электрофорезе. Число выяв-



Фиг. 28. Иммуноэлектрофорез сыворотки крови человека.

Источником антител служила кроличья антисыворотка к сывороточным белкам человека производства фирмы Behringwerke AG (ФРГ).

ляемых при иммуноэлектрофорезе отдельных белковых фракций зависит от качества используемой антисыворотки.

В верхней части фиг. 28 представлена иммуноэлектрофореграмма сыворотки крови человека. С помощью схемы, приведенной ниже, можно ориентироваться в иммуноэлектрофореграммах любой сыворотки человека; на схеме показано относительное расположение белковых фракций, входящих в ее состав.

8. Идентификация отдельных белковых фракций.

а) В одну из лунок вносят в качестве контроля раствор белка известного состава и подвергают его электрофорезу. Если, например, требуется определить присутствие в исследуемой белковой смеси альбумина, то в качестве контроля используют раствор чистого альбумина.

б) Для идентификации используются специфические иммунные сыворотки. Например, присутствие в исследуемой белковой смеси альбумина можно определить также с помощью специфической антиальбуминовой иммунной сыворотки. Если смесь белков содержит альбумин, то на иммуноэлектрофореграмме должна появиться одна полоса преципитации, соответствующая этому белку.

в) Идентификацию фракций можно проводить также с помощью специфического окрашивания. Например, если требуется определить в смеси белков липопроотеиды, полученную иммуноэлектрофореграмму окрашивают красителями, специфически выявляющими липиды. В этом случае должны окраситься только те полосы преципитации, которые содержат липопроотеиды.

9. Методы специфического окрашивания полос преципитации. Ранее описанные методы окрашивания белков и липопроотеидов вполне пригодны для окрашивания полос преципитации при иммуноэлектрофорезе. Ниже приведено несколько методов специфического окрашивания, которые позволяют идентифицировать определенные белковые фракции.

а) Окрашивание гликопротеидов [22]. Растворы: I. 1%-ная иодная кислота в 50%-ном этаноле; II. Смесь 50 мл 0,01 М *n*-фенилэдиамина, 50 мл 0,01 М α -нафтола и 10 мл 10%-ной перекиси водорода.

Методика. Высушенную агаровую пластинку на 15 мин погружают в раствор I, затем 15 мин отмывают дистиллированной водой и окрашивают раствором II до появления легкого фиолетового оттенка. После этого препарат 10 мин промывают проточной водопроводной водой и высушивают при 37°C.

б) Окрашивание церулоплазмينا. Растворы: I. 200 мг ализарина голубого растворяют в 100 мл уксусной кислоты при 55°C и разбавляют 70%-ной уксусной кислотой в 10 раз; II. 70%-ная уксусная кислота.

Методика. Высушенную агаровую пластинку 20 мин окрашивают в растворе I, а затем 30 мин отмывают в растворе II.

в) *Окрашивание гаптоглобина.* 2,0 г бензидина¹ растворяют в 20 мл уксусной кислоты при нагревании. После охлаждения конечный объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл, добавляют 0,5—1,0 г активированного угля, встряхивают, оставляют на 15 мин и затем фильтруют в склянку из темного стекла. Непосредственно перед окрашиванием к раствору бензидина добавляют несколько капель перекиси водорода.

После 15 мин окрашивания агаровую пластинку отмывают дистиллированной водой.

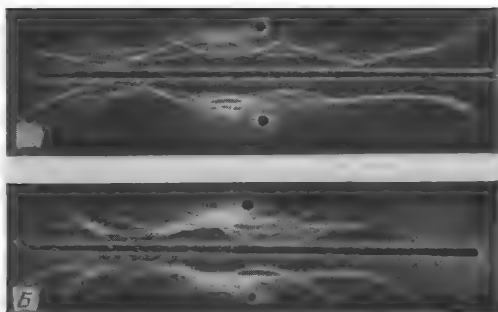
10. Форма полос преципитации позволяет судить о гомогенности или гетерогенности исследуемых белков. Гомогенные белки дают симметричные полосы преципитации правильной формы (например, среди сывороточных белков такую полосу преципитации дает альбумин). Гетерогенная популяция молекул обычно дает вытянутую асимметричную полосу преципитации. Это характерно для иммуноглобулинов нормальной сыворотки человека (IgG, IgM, IgA).

Иммуноглобулины разных классов имеют много общих антигенных детерминант, но различаются по электрофоретической подвижности, поэтому они образуют при иммуноэлектрофорезе вытянутую асимметричную полосу преципитации. Особое значение этому явлению придается при диагностике так называемых моноклональных иммуноглобулинопатий. При этих заболеваниях (например, множественном миеломатозе или макроглобулинемии Вальденштрёма) клон злокачественно пролиферирующих плазматических клеток обычно продуцирует гомогенный моноклональный иммуноглобулин. Патологическое увеличение популяции молекул этого иммуноглобулина приводит к тому, что при иммуноэлектрофорезе можно наблюдать характерную симметричную полосу преципитации. На фиг. 29, где представлены иммуноэлектрофореграммы сыворотки при миеломах IgA- и IgG-типа, можно заметить также, что при значительном увеличении концентрации отдельных белков при моноклональных иммуноглобулинопатиях происходит растворение полос преципитации в избытке антигена. Это явление может стать причиной неверного толкования иммуноэлектрофореграмм, поскольку растворение преципитата воспринимается как отсутствие данной белковой фракции, хотя на самом деле она присутствует в большом избытке. В этих случаях следует устранять избыток антигена 5—10-кратным разбавлением исследуемой сыворотки с высокой концентрацией белка. После этого на иммуноэлектрофореграмме должна появиться характерная для моноклональных иммуноглобулинопатий симметричная полоса преципи-

¹ Бензидин канцерогенен, поэтому работа с ним требует соответствующих мер предосторожности.

тации, отличающаяся от полосы преципитации нормальных иммуноглобулинов (фиг. 29).

11. В отдельных случаях, особенно при иммуноэлектрофоретическом анализе низкомолекулярных белков, удобно применять метод внесения антисыворотки, предложенный Бакхаузом в 1967 г. [2]. После нанесения слоя агарового геля на стеклянную пластин-



Фиг. 29. Иммуноэлектрофорез сыворотки крови при моноклональных иммуноглобулинопатиях.

А. IgG-миелома; Б. IgA-миелома. В верхних лунках — сыворотка больного; в нижних — нормальная сыворотка человека.

ку его продольно разрезают на две равные половины и одну из них удаляют. Затем примерно в 5 мм от линии разреза в геле делают лунку для внесения образца, в которую наливают исследуемый материал, и обычным способом подвергают его электрофорезу. По окончании электрофореза смешивают расплавленный агар со специфической иммунной сывороткой и заливают им свободную половину стекла. Образование преципитатов происходит частично в оставшейся половине агарового геля и частично в геле, нанесенном на стекло после электрофореза. При обычной постановке иммуноэлектрофореза низкомолекулярные белки (например, белки Бенс-Джонса) благодаря быстрой диффузии могут мигрировать на значительное расстояние от лунки и, если они попадут в канавку для иммунной сыворотки, полосы преципитации не образуется. Метод Бакхауза позволяет избежать затруднений такого рода, так как в этом случае канавка для иммунной сыворотки просто отсутствует, а полосы преципитации низкомолекулярных белков появляются в слое агарового геля, нанесенном после электрофореза.

12. Метод иммуноэлектрофореза позволяет сравнивать между собой не только смеси белков (антигены) с помощью данной иммунной сыворотки, но также и иммунные сыворотки с помощью данного антигена. Для такого исследования в пластинке агарового геля вырезают две параллельные канавки, а между ними на расстоянии 3 мм от края каждой делают лунку для образца. В нее вносят раствор определенного белка и, проведя электрофорез, заполняют канавки сравниваемыми иммунными сыворотками. Полосы преципитации, которые появляются с обеих сторон от нанесенного образца, позволяют сопоставлять исследуемые иммунные сыворотки.

13. Приготовление иммунной сыворотки требуемого качества нередко встречает серьезные затруднения. Животные-продуценты существенно различаются по способности синтезировать антитела, причем наряду с межвидовыми имеются значительные индивидуальные различия в иммунореактивности животных-продуцентов в пределах одного вида. Поэтому рекомендуется одним антигеном одновременно иммунизировать несколько животных; тем самым повышается вероятность получения антисыворотки хорошего качества, дающей необходимое число полос преципитации.

14. Описанные выше методы иммуноэлектрофореза применимы только для качественного анализа.

15. Разрешающая способность иммуноэлектрофореза намного превышает возможности зонального электрофореза, но не следует забывать, что, подобно другим методам иммунодиффузии, иммуноэлектрофорез выявляет минимальное число реагирующих систем антиген—антитело.

16. Если электроэндоосмос в агаровом геле при электрофорезе является серьезной помехой иммуноэлектрофоретического анализа, рекомендуется заменить агаровый гель гелем агарозы.

17. *Радиоиммуноэлектрофорез*. Если антиген или антитело пометить радиоактивным изотопом, то с помощью иммуноэлектрофореза можно анализировать чрезвычайно малые количества материала. Известно, что антигенные свойства IgG не меняются, если молекула IgG как антитело входит в иммунный комплекс. Если мы располагаем соответствующей иммунной сывороткой анти-IgG, меченной радиоактивным изотопом, то с ее помощью мы можем выявлять IgG в иммунных комплексах (например, в преципитатах). Радиоиммуноэлектрофорез состоит из следующих стадий:

а) Сначала исследуемый антиген (например, сывороточный альбумин человека) обычным путем подвергают электрофорезу. Затем заполняют канавку для антисыворотки соответствующей иммунной сывороткой (например, кроличьей антисывороткой к сывороточному альбумину человека) и оставляют для диффузии и образования полос преципитации.

б) Как только образуются полосы преципитации, канавку для антисыворотки заполняют меченной ^{131}I антисывороткой к γ -гло-

булину кролика (например, полученной от морской свинки) и вновь оставляют для диффузии.

в) Меченная изотопом иммунная сыворотка реагирует с кроличьим γ -глобулином, входящим в состав полос преципитации (иммунных комплексов). Преципитаты, содержащие изотоп, можно затем выявить с помощью радиоавтографии.

Радиоиммуноэлектрофорез можно осуществить также и с помощью антигенов, меченных радиоактивными изотопами. Методика постановки подобна только что описанной, но после иммуноэлектрофореза в канавку для антисыворотки заливают меченный изотопом антиген (в приведенном выше примере — сывороточный ^{131}I -альбумин человека) и оставляют для диффузии.

5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ПО ОССЕРМАНУ [16]

Принцип метода. Если после иммуноэлектрофореза исследуемой смеси белков в одну из параллельных канавок агаровой пластинки ввести раствор известного белка, а в другую — специфическую антисыворотку к этому белку, то в месте встречи диффундирующих антигенов и антител образуется продольная полоса преципитации. Если исследуемая смесь белков содержит компонент, идентичный известному белку, то соответствующая этому компоненту полоса преципитации по краям сольется с продольной полосой, демонстрируя феномен идентичности по Ухтерлони (см. стр. 131).

Область применения. Если исследователь располагает известными белками (референс-белки) и соответствующими антисыворотками, то с помощью данного метода можно идентифицировать отдельные компоненты белковой смеси неизвестного состава.

При сравнительном анализе белков по Оссерману используются те же приборы и принадлежности, что и при иммуноэлектрофорезе (см. стр. 137).

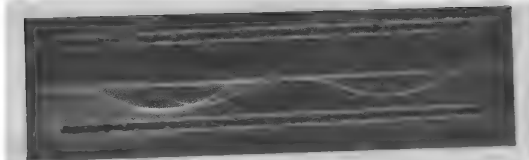
МЕТОДИКА

1. *Приготовление агаровой пластинки:* см. стр. 142.

2. В середине агаровой пластинки вырезают лунку для внесения исследуемого образца, а на расстоянии 3 мм от лунки, по обе стороны от нее, делают две параллельные канавки.

3. После иммуноэлектрофореза исследуемой смеси белков (см. стр. 141) в одну канавку вносят раствор референс-белка, а во вторую заливают иммунную сыворотку к нему (на фиг. 30 — это верхняя канавка). В месте встречи компонентов этой системы, которые диффундируют в агаровом геле, образуются полосы преципитации.

Если исследуемая белковая смесь имеет общие с раствором референс-белка антигены, то продольная полоса преципитации, сливаясь с теми полосами, которые появились ранее при иммуноэлектрофорезе, образует как бы продолжение последних (фиг. 30).



Фиг. 30. Сравнительный анализ белков по Оссерману [16] (объяснение см. в тексте).

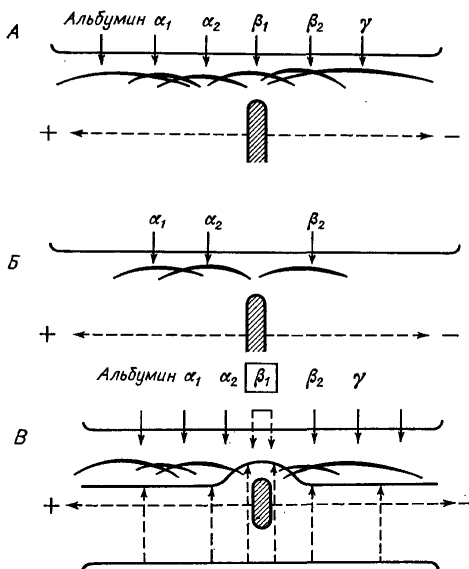
ПРИМЕЧАНИЯ

Для успешного анализа белковых растворов неизвестного состава можно применять следующие методы: 1) иммуноэлектрофорез в тех случаях, когда удастся идентифицировать полосы преципитации, полученные с иммунной сывороткой (фиг. 31, А); 2) метод Оссермана в тех случаях, когда исследователь располагает растворами референс-белка и соответствующей антисывороткой (фиг. 31, В); 3) метод так называемого истощения (фиг. 31, Б), который вкратце заключается в следующем.

Исследуемый белковый раствор неизвестного состава инкубируют со специфической иммунной сывороткой; образовавшийся преципитат удаляют центрифугированием, а надосадочную жидкость в качестве «истощенной» иммунной сыворотки используют при иммуноэлектрофорезе известной смеси белков. В полученной иммуноэлектрофореграмме будут отсутствовать именно те компоненты, которые являются общими для исследуемого белкового раствора и для известной смеси белков, так как они удалили из иммунной сыворотки соответствующие антитела.

6. АБСОРБЦИОННЫЙ ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ [3]

Принцип метода. После электрофоретического разделения исследуемого белка в агаровом геле компоненты специфической иммунной сыворотки диффундируют навстречу полученным фракциям через слой агарового геля, содержащий известные (контрольные) антигены, которые абсорбируют соответствующие антитела и задерживают их дальнейшую миграцию к определяемым антигенам. В результате в образовании полос преципитации принимают участие только те антигены исследуемого образца, которые отличаются от контрольных.



Фиг. 31. Способы анализа белковой смеси с помощью иммуноэлектрофореза (подробное описание см. в тексте).

Область применения. Этот метод можно использовать для идентификации отдельных компонентов белковых смесей неизвестного состава в том случае, если исследователь располагает соответствующей иммунной сывороткой и смесью контрольных (абсорбирующих) антигенов.

МЕТОДИКА

1. Приготовление агаровой пластинки. На стеклянную пластинку размером 10×16 см наносят 40 мл расплавленного 1,5%-ного агара в вероналовом буферном растворе pH 8,2. Затвердевший слой агарового геля разрезают в продольном направлении таким образом, чтобы после удаления лишних участков геля на стекле осталась только полоска шириной 15 мм. Со стороны катода на расстоянии одной трети длины этой полоски геля и на равном расстоянии от ее краев делают лунку для внесения исследуемого образца

диаметром примерно 5 мм и заливают в нее 1—2 капли расплавленного агара.

2. *Электрофорез.* После внесения исследуемого образца проводят электрофорез в течение 7—8 ч при градиенте напряжения 3 В/см.

3. *Нанесение на стекло полосок геля, содержащих абсорбирующие антигены и иммунную сыворотку.* По окончании электрофореза рядом с полоской геля, содержащего разделенные антигены, наливают расплавленный агар, смешанный с раствором контрольных (абсорбирующих) антигенов, таким образом, чтобы получилась вторая полоска шириной 5 мм. После затвердения нанесенного агара рядом со второй наносят третью полоску агарового геля, содержащую иммунную сыворотку. В результате на одном стекле оказываются рядом друг с другом три полоски агарового геля, образующие: а) зону специфической иммунной сыворотки, б) зону абсорбирующих антигенов и в) зону электрофоретически разделенных исследуемых антигенов.

4. *Регистрация результатов.* Образование полос преципитации происходит в течение нескольких дней при 4°C во влажной камере. Их появление можно зарегистрировать, фотографируя нативный или окрашенный препараты (см. стр. 135).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Этот метод весьма полезен, например, при диагностике недостаточности синтеза иммуноглобулинов какого-либо класса. В этом случае электрофоретическому разделению подвергают нормальную сыворотку человека, в зону абсорбирующих антигенов вносят сыворотку больного, а в зону иммунной сыворотки — антисыворотку к сывороточным белкам человека. В образовании полос преципитации с фракциями нормальной сыворотки человека принимают участие только те антиглобулиновые антитела, которые не встретили соответствующих им иммуноглобулинов в сыворотке больного, диффундируя из зоны антисыворотки в зону нормальной сыворотки. В результате появляются полосы преципитации, которые соответствуют отсутствующему классу иммуноглобулинов, например IgG, IgA или IgM.

2. В полоске геля, содержащего абсорбирующие антигены, в местах образования комплексов антиген — антитело появляются прямые полосы преципитации.

7. ИММУННАЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ [10]

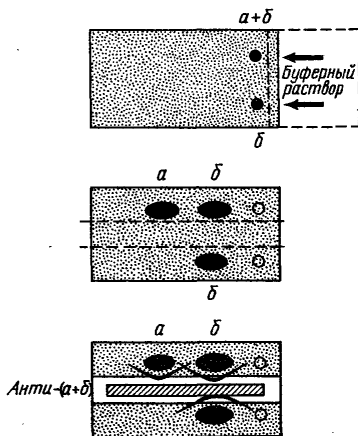
Принцип метода. Метод представляет собой комбинацию фракционирования исследуемого белка при помощи тонкослойной гель-фильтрации с иммунодиффузионным анализом в геле.

Область применения. Получение таких характеристик исследуемых белков, которые определяются размером их молекул и серологическими свойствами.

МЕТОДИКА

1. Тонкослойная гель-фильтрация. На стеклянную пластинку размером 8×20 см наносят слой сефадекса G-100 или G-200 в 0,05 М вероналовом буферном растворе pH 8,4 так, чтобы высота слоя была 0,5 мм (см. стр. 231). Затем пластинку закрепляют под нужным углом в буферном резервуаре, заполненном 0,02 М трис-HCl pH 8,0, содержащим 0,2 М NaCl. Методика уравнивания сефадекса и нанесения образца описаны на стр. 231. Сначала наносят на пластинку 1—2 мкл исследуемого образца и контрольные растворы, затем проводят гель-фильтрацию, пластинку извлекают из прибора и помещают на горизонтальную поверхность.

2. Иммунодиффузия. На участке между зонами разделения исследуемого образца и контрольных веществ гель сефадекса удаляют (фиг. 32). Всю поверхность пластинки заливают слоем расплавленного 1%-ного агара толщиной 1 мм. После его затвердения между зонами исследуемого образца и контрольных соединений вырезают продольную канавку, которую заполняют специфической иммунной сывороткой. Пластинку помещают во влажную камеру и образовавшиеся полосы преципитации фотографируют в нативном состоянии или после окрашивания (фиг. 32).



Фиг. 32. Схема иммуно-гель-фильтрации (объяснение см. в тексте).

ПРИМЕЧАНИЯ

Основное преимущество этого метода заключается в том, что, исследуя очень малые количества белка, можно охарактеризовать его иммунологические свойства и размер молекул.

8. ЭЛЕКТРОСИНЕРЕЗ [4]

Принцип метода. Это один из методов иммунодиффузии, в котором антиген и иммунная сыворотка мигрируют в геле навстречу друг другу не за счет диффузии, а под влиянием электрического поля.

Область применения. Анализ антигенов, обладающих низким коэффициентом диффузии.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление агаровой пластинки* (см. стр. 138).

2. Примерно в середине агаровой пластинки вырезают две круглых лунки диаметром около 5 мм на расстоянии 2—3 см одну от другой. Лунка, расположенная ближе к катоду, предназначена для раствора антигена, а лунка, расположенная в анодной части геля, — для иммунной сыворотки. Непосредственно перед заполнением лунок в каждую из них вносят несколько капель расплавленного агара.

3. После внесения раствора антигена и иммунной сыворотки проводят электрофорез (см. стр. 139) до тех пор, пока в геле между двумя лунками не образуются полосы преципитации.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Под влиянием электрического поля антитела (иммуноглобулины) мигрируют в сторону катода. Если исследуемые антигены (например, белки сыворотки крови) при электрофорезе движутся к аноду, то реакция антиген—антитело происходит в геле между двумя лунками.

2. Электросинерез можно комбинировать с иммуноэлектрофорезом. Для этого после проведения электросинереза на небольшом расстоянии от лунок, заполненных антигеном и антисывороткой, в геле вырезают канавку (см. стр. 137), которую заполняют соответствующей иммунной сывороткой.

9. КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В ГЕЛЕ АГАРОЗЫ, СОДЕРЖАЩЕМ АНТИТЕЛА [14]

Принцип метода. Анализ включает две стадии: а) электрофорез исследуемого белка в геле агарозы и б) повторный электрофорез полученных фракций в геле, содержащем антитела, перпендикулярно к направлению первого разделения. Полоску геля, содержащего фракции исследуемого белка, полученные на первой стадии, помещают на пластинку геля агарозы, содержащего

иммунную сыворотку, и вновь проводят электрофоретическое разделение под прямым углом к первоначальному направлению. О концентрации различных фракций исследуемого белка можно судить по высоте преципитационных пиков, образующихся в результате миграции антигена в геле, содержащем антитела.

Область применения. Идентификация и количественный анализ белковых фракций.

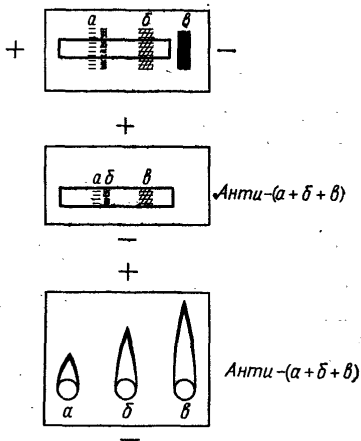
МЕТОДИКА

1. **Приготовление пластинки геля агарозы.** 1%-ный раствор агарозы, содержащий 1 ммоль лактата кальция, готовят на вероналовом буферном растворе с ионной силой 0,05 и рН 8,6.

Подогретую агарозу наслаивают на предметное стекло так, чтобы получился слой геля толщиной 1,5 мм; стекла помещают во влажную камеру и оставляют в холодильнике до затвердения. После этого в катодной трети агарозной пластинки вырезают прямоугольный желобок для исследуемого антигена (фиг. 33).

2. **Электрофорез.** Раствор антигена (исследуемого белка или смеси белков) вносят в желобок и проводят электрофорез в течение 3 ч при градиенте напряжения 10 В/см. Рекомендуется использовать электрофоретический прибор с охлаждением. По окончании электрофореза область разделения исследуемого образца в агарозном геле вырезают в виде узкой продольной полосы, содержащей белковые фракции (фиг. 33), и помещают ее на пластинку агарозного геля с иммунной сывороткой.

3. **Приготовление геля агарозы, содержащего иммунную сыворотку, и вторая стадия анализа (электрофорез фракций, полученных на первой стадии).** Специфическую иммунную сыворотку в соответствующем разведении смешивают с 1%-ной агарозой и наслаивают на стеклянную пластинку размером 10 × 10 см слой толщиной 1,5 мм.



Фиг. 33. Анализ белков с помощью электрофореза в геле агарозы, содержащем антитела (объяснения см. в тексте).

На эту пластинку кладут полоску геля с фракциями исследуемого белка и проводят электрофорез. Пластинку укрепляют в приборе так, чтобы миграция белковых фракций происходила под прямым углом к продольной оси наложенной полоски агарозного геля (фиг. 33). Электрофорез продолжается 30—90 мин при градиенте напряжения 10 В/см. В ходе электрофореза белковые фракции диффундируют из полоски в гель, содержащий антитела. Мигрируя в нем под действием электрического поля, они образуют преципитационные «пики» в результате специфической реакции с соответствующими антителами. Контуры преципитационных пиков формируются благодаря электрофоретической миграции антигена, а также постепенному уменьшению его избытка в результате этой миграции в геле агарозы. (Известно, что избыток антигена растворяет иммунные преципитаты, поэтому полосы преципитации образуются только там, где избыток антигена исчезает благодаря электрофоретической миграции.)

4. Высота преципитационных пиков, т. е. расстояние между полоской геля, в которой первоначально содержались белковые фракции, и вершиной пика, пропорциональна концентрации антигенов.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. В предварительных опытах рекомендуется уточнить оптимальное соотношение раствора агарозы и иммунной сыворотки в конкретных условиях, т. е. для данного исследуемого антигена и для имеющейся в распоряжении антисыворотки. Если иммунная сыворотка достаточно активна, то ее концентрация в агарозном геле не должна превышать 1—5%.

2. Этот метод позволяет определять концентрацию данного белка в белковой смеси при условии, что исследователь располагает соответствующей моноспецифической антисывороткой. В качестве примера ниже описана методика определения концентрации IgG в сыворотке крови.

На стеклянную пластинку обычным способом наносят 1%-ный гель агарозы, содержащий 2,5%-ную иммунную сыворотку анти-IgG. В затвердевшем геле агарозы вырезают нужное число круглых лунок для исследуемой сыворотки и IgG и заливают в них по несколько капель агарозного раствора. Препараты IgG известной концентрации в соответствующем разведении вносят в несколько лунок; в остальные лунки заливают образцы исследуемых сывороток и проводят электрофорез, как описано выше. В зависимости от соотношения концентрации антигена и антител продолжительность электрофореза может варьировать от 2 до 10 ч. Электрофорез следует закончить, когда прекратится увеличение преципитационных пиков, т. е. когда избыток антигена будет нивелирован электро-

форетической миграцией. По окончании электрофореза измеряют расстояние от вершины пика до центра лунки, из которой началась миграция исследуемого образца. Полученная величина прямо пропорциональна концентрации антигена, в данном случае IgG, в лунке. Основываясь на данных, полученных при соответствующих разведениях препарата IgG известной концентрации, на миллиметровке строят калибровочную кривую, по которой определяют концентрацию IgG в исследуемых образцах сывороток.

3. Количественную оценку результатов и фоторегистрацию преципитационных пиков можно проводить как на нативных, так и на окрашенных препаратах.

10. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ИММУНОДИФфуЗИИ

Попытки разработать методы иммунодиффузии, позволяющие количественно оценивать содержание антигенов и антител, делались неоднократно. Одна группа таких методов основывается на двойной диффузии в геле по Ухтерлони (см. стр. 131), другая — на измерении скорости диффузии и степени мутности полос преципитации при иммуноэлектрофорезе (стр. 137). Пока эти методы еще не получили широкого распространения.

МЕТОД ГРАДИЕНТА КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИТЕЛ ПО ФЕЙНБЕРГУ [6]

Принцип метода. В результате диффузии антигена в пластинке агарового геля, содержащего иммунную сыворотку, образуется преципитат. Наибольшее разведение антигена, при котором еще происходит преципитация, является его титром.

Область применения. Титрование раствора антигена.

МЕТОДИКА

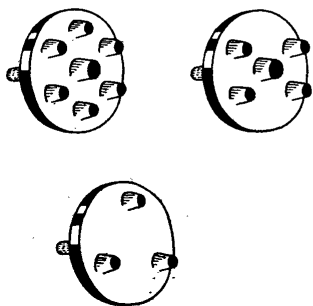
1. *Приготовление пластинки агарового геля.* 1%-ный расплавленный агар наливают на дно чашки Петри (см. стр. 131). В затвердевшем агаровом геле при помощи пробойника для пробок или иного подходящего для этой цели инструмента (фиг. 34) делают лунки для исследуемого антигена и антисыворотки, как описано на стр. 131. Центральная лунка в диаметре должна примерно в 4 раза превышать расположенные на равном расстоянии от нее периферические лунки (12—16 и 3—4 мм соответственно). Две соседние периферические лунки должны отстоять друг от друга дальше, чем от центральной лунки.

2. *Титрование антигена.* В центральную лунку заливают 0,2 мл иммунной сыворотки, агаровую пластинку помещают во влажную камеру и оставляют при 37°C на 24—72 ч. В результате диффузии иммунной сыворотки от центральной лунки по направлению к периферическим возникает градиент концентрации антител.

По истечении времени, достаточного для образования градиента концентрации антител, в периферические лунки заливают заранее

приготовленные препараты исследуемого антигена в соответствующем разведении. В каждую лунку с помощью микропипетки или капиллярной пипетки, имеющей метку, вносят строго один и тот же объем раствора.

Через 24 ч повторной инкубации во влажной камере при 37°C в агаровом геле вокруг периферических лунок образуются полосы (или кольца) преципитации. Регистрируя их, определяют наибольшее разведение антигена, при котором еще наблюдается реакция преципитации, и принимают его за титр исследуемого антигена.



Фиг. 34. Штампы для вырезания лунок в агаровом геле.

ПРИМЕЧАНИЯ

Существует другой, менее чувствительный метод титрования антигена или антител, также разработанный Фейнбергом и заключающийся в следующем.

Специфическую иммунную сыворотку при титровании антигена или раствор известного антигена при титровании антисыворотки смешивают с расплавленным агаром и выливают на дно чашки Петри.

После затвердения агара в геле вырезают лунки и заполняют их раствором антигена или антисыворотки. Диффундируя в геле, антиген или антитела встречаются с соответствующим специфическим партнером, что приводит к весьма быстрому появлению колец преципитации вокруг лунок. Реакцию можно учитывать уже через 30 мин, но окончательную оценку следует проводить через 24 ч инкубации при 37°C во влажной камере. Ошибка этого метода количественного определения антигенов и антител составляет $\pm 25\%$. Точность метода повышается, если ставить много параллельных проб.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО АНТИГЕНА В СЛОЕ АГАРОВОГО ГЕЛЯ, СОДЕРЖАЩЕГО СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА [5]

Принцип метода. Исследуемый белковый антиген, диффундируя из лунки, образует в агаровом геле, содержащем моноспецифические антитела, преципитат в виде кольца, диаметр которого пропорционален концентрации этого антигена.

Область применения. Количественное определение белков, определение концентрации индивидуальных компонентов белковой смеси (например, сыворотки крови).

МЕТОДИКА

1. *Приготовление агаровой пластинки, содержащей антитела.* Готовят 3%-ный агар на 0,03 М калий-фосфатном буферном растворе pH 8,0, содержащем 0,1 М NaCl, и помещают его в водяную баню при 56°C. Соответствующую моноспецифическую антисыворотку разбавляют в зависимости от титра фосфатным буферным раствором (см. примечание 2) и нагревают также до 56°C. 8 мл нагретого 3%-ного агара и 8 мл подогретой антисыворотки смешивают при 56°C и 15 мл смеси наливают на стеклянную пластинку размером 8 × 10 см, расположенную на горизонтальной поверхности. После затвердения агара пластинку помещают во влажную камеру и хранят в холодильнике до использования. (Рекомендуется к смеси агара и антисыворотки добавлять мертиолат в разведении 1 : 10 000.)

2. *Приготовление лунок для исследуемого антигена.* При помощи подходящего инструмента (см. стр. 131) в агаровом геле вырезают лунки для антигена диаметром 2,4 мм, расположенные на расстоянии 12 мм друг от друга. Обычно на углах пластинки поверхность агара получается недостаточно ровной и образующиеся кольца преципитации не имеют правильных очертаний, поэтому четыре угловых лунки оставляют пустыми.

3. *Заполнение лунок.* Часть лунок в агаровом геле заполняют капиллярной пипеткой заранее приготовленными растворами белка известной концентрации в соответствующих разведениях. Оставшиеся лунки наливают исследуемые образцы белковых смесей, например сыворотки крови. Следует тщательно следить за тем, чтобы во всех лунках был налит одинаковый объем растворов, заполняющий их точно до краев. После этого агаровую пластинку помещают во влажную камеру и на 24 ч оставляют в холодильнике.

4. *Оценка результатов.* В агаровом геле, содержащем моноспецифические антитела и диффундирующий антиген, образуются кольца преципитации. Диаметр такого кольца проще всего измерить, рассматривая его на темном фоне с подсветкой под опреде-

ленным углом. Сначала измеряют диаметры преципитационных колец вокруг лунок с разведенными стандартными растворами белка и строят график зависимости этих величин (в мм) от логарифма концентрации раствора. Измерив диаметры преципитационных колец вокруг лунок исследуемых образцов, с помощью полученной калибровочной кривой определяют концентрации анализируемого белка.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Для успешного осуществления этого метода основное значение имеют два момента. Во первых, наличие иммунохимически чистого (т. е. не содержащего других белковых фракций) препарата того белка, концентрацию которого требуется определить в смеси. Этот белок используется в реакции в виде стандартного раствора известной концентрации. Во-вторых, необходимо располагать моноспецифической (т. е. реагирующей только с данным белком) иммунной сывороткой.

2. Титры антител в иммунных сыворотках могут широко варьировать. Поэтому в предварительных опытах следует определить то разведение антисыворотки, при котором наблюдаются наиболее четкие и легко регистрируемые преципитационные кольца. В зависимости от титра имеющейся в распоряжении исследователя антисыворотки ее можно использовать в 8-, 16- или 32-кратном разведении.

3. При учете результатов реакции через 24 ч между концентрацией антигена и диаметром преципитационного кольца выявляется логарифмическая зависимость. Однако можно производить учет реакции и через больший отрезок времени, продолжая наблюдать за диффузией антигена в геле и ежедневно измеряя диаметры преципитационных колец. Через несколько дней в наблюдаемой системе наступает равновесие, т. е. избыток антигена в лунке исчезает и увеличение диаметра преципитационного кольца прекращается. На этой стадии существует линейная зависимость между концентрацией антигена и диаметром преципитационного кольца.

4. Данный метод хорошо себя зарекомендовал при определении содержания тех фракций сыворотки крови, которые удается выделить в достаточно чистом виде (например, IgG, IgA, IgM, трансферрин и альбумин). Вообще с помощью этого метода можно определить концентрацию любого гомогенного белка, если располагать специфичной к нему антисывороткой.

5. Результаты реакции можно зарегистрировать, фотографируя нативный препарат или окрашивая его красителями, выявляющими белок (см. стр. 135). Окрашивание в ряде случаев облегчает

регистрацию результатов, так как окрашенные преципитационные кольца легче измерять. Однако оно может и затруднить измерение, если при этом, например, изменяется форма кольца.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПО БАКХАУЗУ [1]

Сначала исследуемый антиген подвергают электрофорезу макрометодом, описанным на стр. 137. Затем в непосредственной близости от области разделения антигена в агаровом геле вырезают широкий желобок, который заполняют смесью расплавленного агара с иммунной сывороткой. Белки, разделенные в электрическом поле, диффундируют в агаровый гель, содержащий антители. Расстояние, проходимое белками обусловлено закономерностями линейной диффузии в геле (см. стр. 128). Поэтому, измерив смещение вершин преципитационных полос от границы желобка, можно определить скорость диффузии, т. е. величину k , а с ее помощью и концентрацию исследуемых белковых фракций.

11. ИММУНОДИФфуЗИОННЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ НА АЦЕТАТ-ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАНАХ [13]

Примененные Коном (стр. 71) для электрофореза ацетат-целлюлозные мембраны могут быть также успешно использованы в опытах по иммунодиффузии. Ацетат-целлюлозные мембраны лишены ряда недостатков, присущих агаровому гелю.

ДВУМЕРНАЯ ДВОЙНАЯ ДИФфуЗИЯ

Принцип метода. Раствор белкового антигена и специфическая иммунная сыворотка, диффундируя навстречу друг другу на ацетат-целлюлозной мембране, в месте встречи образуют полосы преципитации.

Область применения: см. стр. 131.

МЕТОДИКА

Из листа ацетат-целлюлозной мембраны вырезают круг нужного диаметра и карандашом или недиффундирующей краской отмечают на нем места нанесения антигена и иммунной сыворотки. Затем мембрану смачивают буферным раствором, осторожно промокают фильтровальной бумагой и в горизонтальном положении помещают во влажную камеру (например, на дно чашки Петри, крышка которой изнутри выстлана влажной фильтровальной бумагой).

В отмеченные места мембраны капиллярной пипеткой наносят 1—5 мкл раствора антигена и иммунной сыворотки в виде небольших пятен или коротких линий. Обычно иммунную сыворотку

наносят на расстоянии 10 мм от места нанесения антигена, но в зависимости от цели эксперимента это расстояние можно варьировать. Мембрану держат во влажной камере до тех пор, пока нанесенный материал полностью не впитается, и затем погружают ее в вазелиновое масло.

В течение двух дней в мембране, оставленной под вазелиновым маслом, при комнатной температуре образуются полосы преципитации.

По окончании инкубации мембрану извлекают из масла и через некоторое время, когда стечет его избыток, быстро проводят через эфир. После этого мембрану на 1—5 ч помещают в физиологический раствор хлористого натрия для удаления растворимых белков, не участвовавших в реакции преципитации; затем ее извлекают, промокают фильтровальной бумагой и окрашивают для выявления полос преципитации, как описано на стр. 73.

ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Принцип метода. Исследуемый антиген подвергают электрофорезу на ацетат-целлюлозной мембране. После этого на мембрану наносят специфическую иммунную сыворотку, и в результате ее диффузии образуются полосы преципитации, выявляемые при окрашивании.

Область применения. (см. стр. 137).

Приборы (см. стр. 71).

МЕТОДИКА

Электрофорез на ацетат-целлюлозных мембранах описан на стр. 71. По окончании электрофореза на закрепленную в электрофоретической камере мембрану капиллярной пипеткой наносят иммунную сыворотку. Наносить следует по возможности одним движением на расстоянии 0,1—1,0 см от места нанесения исследуемого образца параллельно направлению его разделения при электрофорезе. После того как нанесенная иммунная сыворотка впитается, мембрану извлекают из электрофоретической камеры и погружают в вазелиновое масло. Остальные стадии методики те же, что и в предыдущем методе исследования (стр. 161).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Интерпретация результатов иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза на ацетат-целлюлозной мембране не отличается от описанной соответственно на стр. 131 и 142.

2. Вазелиновое масло не денатурирует белки, но эфир обладает этим свойством, поэтому, удаляя масло, не следует держать в эфире

ре мембрану дольше 10—20 с. В заключение рекомендуется промыть мембрану проточной водой.

3. Необходимо следить за тем, чтобы перед погружением в вазелиновое масло мембрана была равномерно смочена буферным раствором. Если часть мембраны подсохла, ее следует вновь поместить во влажную камеру.

4. Во избежание загрязнения следует брать мембрану только пинцетом. Необходимо постоянно следить за тем, чтобы используемые растворы и материалы не были проросшими, так как бактериальный рост мешает проведению реакции.

5. Использование мембраны вместо агарового геля дает существенные преимущества: для анализа требуется еще меньше исследуемого материала, мембраны проще хранить и, кроме того, их легче окрасить.

Цитированная литература

1. *Backhausz R.*, Serologie, in: Rajka Ö, Allergie und allergische Erkrankungen, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1950.
2. *Backhausz R.*, Immunodiffusion und Immunoelektrophorese, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1967.
3. *Bátory G.*, Ann. Immunol., Hung., 5, 127 (1962).
4. *Bussard D.*, Biochim. Biophys. Acta, 34, 258 (1959).
5. *Fahey J. L., McKelvey E. M.*, J. Immunol., 94, 84 (1965).
6. *Feinberg J. G.*, Int. Arch. Allergy, 11, 129 (1957).
7. *Freund J.*, Annu. Rev. Microbiol., 1, 291 (1947).
8. *Grabar P., Williams C. A.*, Biochim. Biophys. Acta, 10, 193 (1953).
9. *Grabar P., Williams C. A.*, Biochim. Biophys. Acta, 17, 67 (1955).
10. *Hanson L. A., Johansson B. G., Rymo L.*, Clin. Chim. Acta, 14, 391 (1966).
11. *Hartmann F.*, Z. Rheumaforsch, 16, 150 (1957).
12. *Heidelberger M. F. E., Kendall C. M., Soo Hoo C. M.*, J. Exp. Med., 58, 137 (1933).
13. *Kohn J.*, Nature, 183, 1512 (1959).
14. *Laurell L. B.*, Anal. Biochem., 15, 45 (1966).
15. *Oakley C. L., Fulthorpe A. J.*, J. Path. Bact., 65, 49 (1953).
16. *Ossermann E. P.*, J. Immunol., 84, 93 (1960).
17. *Ouchterlony Ö.*, Acta Path. Microbiol. Scand., 32, 231 (1953).
18. *Oudin J.*, Ann. Inst. Pasteur, 75, 30 (1948).
19. *Oudin J.*, Ann. Inst. Pasteur, 75, 109 (1948).
20. *Preer J. R., Jr.*, J. Immunol., 77, 52 (1956).
21. *Scheidegger J. J.*, Int. Arch. Allergy, 7, 103 (1955).
22. *Uriel J. P., Grabar P., Wunderly Ch.*, Clin. Chim. Acta, 2, 35 (1957).

Рекомендуемая литература

- Boyd W. C.*, Fundamentals of Immunology, Interscience Publ. Ltd., London, 1956. (У. Бойд, Основы иммунологии, изд-во «Мир», М., 1969.)
Crowle A. J., Immunodiffusion, Academic Press, New York, London, 1961.
Determann H., Gel-chromatography, Springer Verlag, Berlin, 1968. (Г. Дереман, Гель-хроматография, изд-во «Мир», М., 1970.)
Kabat E. A., Einführung in die Immunochemie, Springer Verlag, 1971.

- Kabat E. A., Mayer M. M.*, Experimental Immunochemistry, Thomas Publ., Springfield, 1961. (Е. Кабот, М. Мейер, Экспериментальная иммунология, Медицина, М., 1968.)
- Keil B., Sormova Z.*, Laboratoriumstechnik für Biochemiker, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1965.
- Ouchterlony O.*, Diffusion-in-gel methods for immunological analysis, Progr. Allergy, 6, 30 (1962).
- Weir D. M.*, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973.
- Williams C. A., Chase M. W.*, Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. III, Academic Press, New York, London, 1971.

Глава V

ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

А. ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ГИДРОЛИЗА

SH-группы остатков цистеина и существующие исходно или возникающие в ходе реакции дисульфидные связи могут стать источником артефактов при полном или частичном гидролизе исследуемых белков и пептидов. Дисульфидные мостики, возникающие в результате окисления SH-групп, могут: а) неспецифически расщепиться в ходе гидролиза или б) при ферментативном гидролизе обуславливать образование фрагментов сложной структуры.

В связи с этим для предупреждения нежелательных побочных реакций перед частичным или полным гидролизом рекомендуется исследуемый материал предварительно окислять или восстанавливать.

1. ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ НАДМУРАВЬИНОЙ КИСЛОТОЙ

К 9 мл 80 %-ной муравьиной кислоты прибавляют 1 мл 30 %-ной перекиси водорода и оставляют смесь на 30 мин при 4°C. В полученной надмуравьиной кислоте растворяют исследуемый материал, инкубируют при 4°C 60 мин и упаривают в ротационном испарителе при низкой температуре. Сухой остаток растворяют или суспендируют в небольшом объеме дистиллированной воды и вновь упаривают.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. При окислении надмуравьиной кислотой остатки цистеина или цистина превращаются в стабильную цистеиновую кислоту, остаток метионина — в стабильный метионинсульфон, а тирозин и триптофан полностью разрушаются.

2. Если исследуемый материал (например, высокомолекулярный белок) не растворяется в надмуравьиной кислоте, то его суспендируют в ней и инкубируют в течение 3—5 ч при 4°C с перемешиванием.

2. ВОССТАНОВЛЕНИЕ И КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Исследуемый материал растворяют в 6 М мочеvine при pH 7,2 и добавляют меркаптоэтанол в 10-кратном молярном избытке по отношению к содержанию цистеина. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч, затем к ней добавляют иод- или бромацетат в 50—100-кратном молярном избытке по отношению к цистину, содержащемуся в исследуемом образце, оставляют на 2 ч при комнатной температуре и на сутки при 4°C. После этого раствор диализуют против дистиллированной воды для удаления мочевины.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Поскольку свободные SH-группы восстановленных белков очень реакционноспособны, для предотвращения реокисления их следует карбоксиметилировать иод- или бромацетатом.

2. Восстановленные и карбоксиметилированные белки обычно плохо растворяются в воде. Если при снижении концентрации мочевины они выпадают в осадок, то необходимость диализа отпадает. В этом случае белок, выпавший в осадок, можно непосредственно отмыть от мочевины 0,01 н. HCl, при этом удаляется также избыток алкилирующего реагента.

3. После карбоксиметилирования и отмывания кислотой или после диализа исследуемый материал рекомендуется суспендировать в дистиллированной воде и лиофилизировать.

Г.Б. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ В 6 н. HCl

Принцип метода. Гидролиз проводят при 105°C в 6 н. HCl в запаянной ампуле.

Область применения. Гидролиз белков и пептидов для определения их аминокислотного состава.

МЕТОДИКА

а) *Очистка HCl.* Концентрированную HCl многократно перегоняют в стеклянном дистилляционном аппарате (фирма Quikfift, США) над SnCl_2 . В экспериментах используют фракцию с постоянной точкой кипения.

б) *Гидролиз.* Гидролизуемый материал растворяют или суспендируют в 100—200-кратном избытке 6 н. HCl в ампуле.

Через ампулу продувают азот или откачивают из нее воздух, а затем ее запаивают и 24—72 ч инкубируют при 105°C.

в) *Удаление соляной кислоты.* Гидролизат большого объема разбавляют дистиллированной водой и затем упаривают в ротационном испарителе. Сухой остаток суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды и упаривание повторяют. Гидролизат в небольшом объеме переносят в чашку Петри и для удаления кислоты помещают в вакуумный эксикатор над КОН или P_2O_5 .

ПРИМЕЧАНИЕ

При гидролизе происходит разрушение некоторых аминокислот: полностью распадается триптофан, на 50—60% — карбоксиметилцистеин и на 5—10% — треонин и серин. Эти потери следует учитывать при количественном анализе, вводя соответствующие поправки. Чем быстрее производится удаление кислоты, тем меньше вероятность нежелательных побочных реакций.

В. ЧАСТИЧНЫЙ КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Принцип метода. Если исследуемый белок или пептид, растворенный в концентрированной HCl, инкубировать при 37°C в течение 72—96 ч, то происходит их частичное разрушение. В полученном гидролизате среди прочих продуктов расщепления преобладают ди- и трипептиды, т. е. при гидролизе происходит расщепление относительно небольшой части пептидных связей.

Область применения. Структурный анализ больших пептидов, сравнительный анализ белков, выделение определенных пептидов (например, кислых, основных и нейтральных пептидов) из белков и полипептидов.

МЕТОДИКА

Белок или пептид гидролизуют в 100-кратном избытке концентрированной HCl при 37°C в течение 3—4 дней в запаянных ампулах, из которых откачан воздух. После гидролиза кислоту удаляют, как описано выше.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Во время гидролиза происходит разрушение всех остатков триптофана.

2. Гидролизаты в среднем на 25% состоят из свободных аминокислот, а содержащиеся в них пептиды в основном представлены дипептидами.

3. Частичный гидролиз не в концентрированной, а в разбавленной кислоте может привести к артефактам, возникающим в результате реакций транспептидирования.

4. Перед частичным гидролизом рекомендуется окислить исследуемый материал надмуравьиной кислотой в силу тех же самых причин, о которых уже упоминалось в разделе, посвященном полному гидролизу.

Г. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ ТРИПСИНОМ

Принцип метода. Под действием трипсина в белке или пептиде происходит расщепление пептидных связей, образованных остатками лизина и аргинина.

Область применения. Исследование структуры белка.

МЕТОДИКА

1. *Выбор подходящего препарата трипсина и его предварительная очистка.* Трипсин является наиболее изученным высокоспецифическим протеолитическим ферментом, который способен избирательно расщеплять пептидные связи, образованные остатками лизина и аргинина. Однако имеющиеся в продаже препараты трипсина, приготовленные из экстрактов поджелудочной железы, могут быть загрязнены другими протеазами, поэтому необходимо тщательно подбирать подходящий для конкретных целей препарат трипсина. Лучше всего пользоваться препаратом, классифицированным как «свободный от химотрипсина». Если в распоряжении исследователя нет такого препарата, то рекомендуется очистить имеющийся трипсин следующим образом: фермент растворяют в 0,01 н. HCl и инкубируют при 37°C в течение 16 ч, затем раствор фильтруют и доводят pH до 7,8.

2. *Триптический гидролиз.* Гидролизуемый материал растворяют или суспендируют в 0,1 М растворе двууглекислого аммония до конечной концентрации 1% и добавляют к нему $\frac{1}{30}$ часть (по отношению к количеству белка) трипсина. Смесь инкубируют при 37°C 3 ч, затем добавляют еще $\frac{1}{30}$ часть трипсина, вновь инкубируют в течение 1 ч, помещают гидролизат в кипящую водяную баню на 15 мин, фильтруют и лиофилизируют.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Гидролиз нерастворимых белков и белковых производных рекомендуется проводить в автотитраторе. Гидролизуемый материал суспендируют в дистиллированной воде, 0,05 н. раствором NaOH доводят pH до 7,5, добавляют трипсин и проводят реакцию при 37°C в атмосфере азота, постоянно перемешивая суспензию и поддерживая pH 7,5 добавлением 0,05 н. раствора NaOH. Гидролиз продолжается в течение 4—5 ч.

2. Нативные белки либо вовсе не атакуются трипсином, либо перевариваются крайне медленно. Не следует забывать также, что при триптическом гидролизе могут образоваться высокомолекулярные нерастворимые структуры, устойчивые к действию фермента, так называемые «кор»-структуры (core).

3. С помощью обратимой или необратимой блокировки ϵ -NH₂-групп остатков лизина можно ограничить триптический гидролиз расщеплением только пептидных связей аргинина. Обратимую блокировку можно вызвать, например, с помощью трифторацетилирования.

Д. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ ХИМОТРИПСИНОМ

Принцип метода. Под действием химотрипсина разрушаются пептидные связи, в образовании которых принимают участие карбоксильные группы ароматических аминокислот.

МЕТОДИКА

К 1%-ному раствору гидролизуемого субстрата (белка) прибавляют $\frac{1}{30}$ часть (по отношению к количеству белка) кристаллического химотрипсина. Смесь помещают в автотитратор и гидролизуют в атмосфере азота при медленном перемешивании, поддерживая pH 8,0 автоматическим добавлением 0,1 н. раствора NaOH. Гидролиз продолжается до тех пор, пока не прекратится потребление раствора щелочи. Обычно для этого требуется 4—8 ч, после чего фермент инактивируют кипячением, поместив реакционную смесь на 10 мин в кипящую водяную баню. Осадок удаляют фильтрованием, а фильтрат лиофилизируют.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Химотрипсин гораздо менее специфичен, чем трипсин. Избирательное расщепление пептидных связей, в которых принимают участие карбоксильные группы ароматических аминокислот, происходит только при краткосрочном гидролизе. Длительный гидролиз приводит к разрушению и других пептидных связей, например образованных остатками лейцина, гистидина и глутамина.

2. Очень устойчивы к действию химотрипсина связи Тир-Про и Фен-Про, частично устойчивы связи, подобные Тир-Тир.

Е. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ ПЕПСИНОМ

Принцип метода. В молекуле белка и пептида пепсин способен разрывать пептидные связи нескольких типов, поэтому в результате гидролиза получается сложная смесь пептидов.

Область применения. Структурный анализ белков и пептидов.

МЕТОДИКА

К 1%-ному раствору гидролизуемого субстрата (белка) в 0,01 н. HCl прибавляют $\frac{1}{30}$ часть (по отношению к количеству белка) кристаллического пепсина. Смесь инкубируют 16—18 ч при 25°C, затем нейтрализуют и лиофилизируют.

ПРИМЕЧАНИЯ

Пепсин не обладает специфичностью. При пепсиновом гидролизе может происходить расщепление следующих пептидных связей: X-Тир, X-Фен, Лей-X, X-Лей, Глу-X, X-Глу и т. д.

Ж. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ ПАПАИНОМ

Принцип метода. Папаин, не обладающий выраженной специфичностью, гидролизует белки и пептиды до мелких фрагментов.

Область применения. Структурный анализ белков и пептидов.

МЕТОДИКА

1. *Активация папаина.* 10 мг имеющегося в продаже папаина растворяют в 1 мл 1%-ного NaCl и выдерживают при 37°C в течение 1 ч. Сразу же после такой обработки фермент готов для использования.

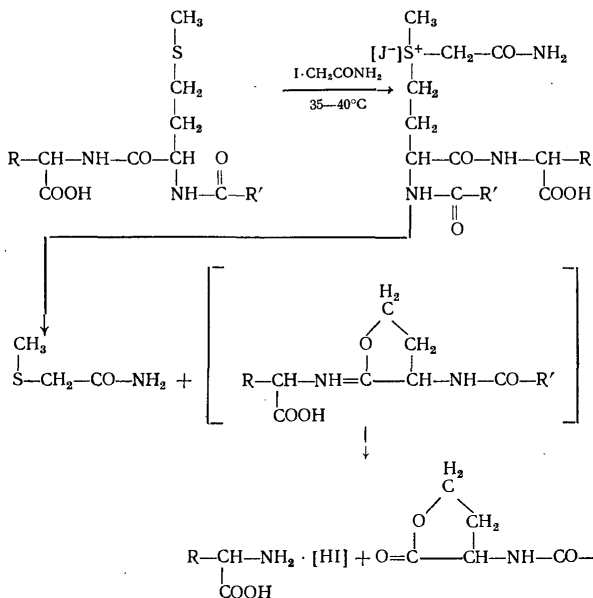
2. *Папаиновый гидролиз.* К 1%-ному раствору гидролизуемого субстрата (белка) прибавляют папаин до конечной концентрации 0,02% и 1,0 н. NaOH подводят pH до 7,0. Смесь инкубируют в автотитраторе при комнатной температуре в атмосфере азота, медленно перемешивая на магнитной мешалке в течение 20—24 ч. Реакцию останавливают кипячением, реакционную смесь фильтруют и лиофилизируют.

ПРИМЕЧАНИЕ

Папаин — не специфический фермент, он расщепляет различные пептидные связи, например такие, как Глу-Гли, Цис SO₃H-Сер, Гли-Лей, Глу-Асп и т. д.

3. РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВ БРОМЦИАНОМ

Принцип метода. В кислой среде бромциан специфически расщепляет полипептидные цепи белков по метиониновым остаткам с образованием гомосеринлактона (иодацетамид взаимодействует с белками подобно бромциану). Реакция протекает по следующей схеме:



Область применения. Расщепление белков на относительно крупные полипептиды при их структурном исследовании.

МЕТОДИКА

Исследуемый белок растворяют или суспендируют в 0,1 н. HCl, прибавляют 30-кратный избыток бромциана, инкубируют в вытяжном шкафу с перемешиванием в течение 24 ч и затем реакционную смесь лиофилизируют.

ПРИМЕЧАНИЕ

Для успешного анализа весьма важно выбрать подходящий метод фракционирования и очистки крупных полипептидных фрагментов, появившихся в результате действия бромциана на белок. Вначале удобно провести предварительное фракционирование по

размеру молекул с помощью гель-фильтрации, а затем применить ионообменную хроматографию на колонке ДЭАЭ- или КМ-целлюлозы, лучше в присутствии мочевины.

Рекомендуемая литература

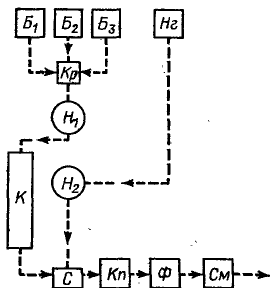
- Boyer P. D.*, The Enzymes, Vol. III, Academic Press, New York, London, 1971.
Colowick S. P., Kaplan N. O., eds., Methods in Enzymology, Vol. XXV, Academic Press, New York, London, 1972.
Hill R. L., Adv. Protein Chem., **20**, 37 (1965).
Kasper C. B., in: Needleman S. P. ed., Protein Sequence Determination, p. 137—165, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg, New York, 1970.
Wilkop B., Adv. Protein Chem., **16**, 221 (1961).

Глава VI

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ

Принцип метода (фиг. 35). Анализируемый материал фракционируется на колонке K , заполненной смолой типа дауэкс 50×8 . Подача буферных растворов (B_1, B_2, B_3) осуществляется насосом H_1 и регулируется краном Kp . Выходящая из колонки жидкость поступает в смеситель C , содержащий раствор нингидрина (H_2), который подается насосом H_2 . Эта реакционная смесь проходит через капилляр Kn , погруженный в водяную баню с температурой $100^\circ C$, где и происходит характерная для аминокислот цветная реакция. Далее окрашенный элюат проходит через спектрофотометр Φ , показания которого регистрируются самописцем $См$.

Область применения. Химические и биохимические исследования белка, синтез аминокислот и пептидов, исследования гормонов, клиническая диагностика, экспериментальная и промышленная энзимология, селекция растений и др.



Фиг. 35. Схема работы автоматического аминокислотного анализатора (обозначения см. в тексте).

МЕТОДИКА

1. *Выбор аналитического метода.* Аминокислоты можно определять с помощью двух- или одноколоночного метода. В первом случае основные аминокислоты анализируют на отдельной колонке с высотой столбика смолы 6—8 см, а кислые и нейтральные аминокислоты — на другой, более длинной колонке высотой 50 см. При этом для определения основных аминокислот требуется около 1 ч,

а для определения кислых и нейтральных аминокислот — около 3 ч.

Во втором методе для определения всех аминокислот используют лишь одну колонку. Время, необходимое для анализа, в этом случае зависит от числа используемых буферных растворов, что в свою очередь определяется имеющейся аппаратурой. Если прибор, например анализатор Унихром фирмы «Beckman» (США), автоматически позволяет производить однократную смену одного буферного раствора на другой, то предпочтительнее применять двухбуферную систему. В этом случае весь анализ занимает 4 ч. Если же прибор позволяет автоматически менять протекающий буферный раствор два или несколько раз, то используют систему из трех буферных растворов, что сокращает продолжительность анализа до 3 ч. При соответствующей комбинации методов продолжительность анализа двухколоночным методом можно еще уменьшить (см. ниже).

2. *Аппаратура.* В настоящее время можно приобрести автоматические аминокислотные анализаторы нескольких типов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Для обычных целей более экономичны простые анализаторы. Это определяется скорее не ценой, а надежностью как в обеспечении непрерывности операции, так и в способе программирования работы прибора. По-видимому, прибор с приспособлением для автоматического нанесения образца, надежно обеспечивающий непрерывность в работе, можно считать вполне экономичным.

Аминокислотный анализатор — это сложный прибор, требующий постоянного ухода даже при аккуратном обращении с ним. Анализатор не должен выключаться на длительное время (1—2 дня). Буферные растворы являются прекрасными средами для размножения грибов и других микроорганизмов. Даже при 1—2-дневной остановке прибора возможно бактериальное прорастание растворов, искажающее результаты анализа (см. источники ошибок). Если прибор постоянно не используется, то следует каждый день включать его на несколько минут для циркуляции растворов и менять при этом положение всех кранов. Когда прибор выключают на длительное время, необходимо удалить буферные растворы и промыть его дистиллированной водой. Смола должна храниться в щелочном растворе в колонке или в каком-либо сосуде.

3. *Смола.* В современных анализаторах применяются смолы со сферическими частицами, благодаря которым скорость протекания растворов через колонку при относительно небольшом давлении может быть довольно высокой. Если частицы смолы имеют одинаковые размеры и давление в колонке постоянно в определенных пределах, то смола заметно не сжимается. Но даже при абсолютной однородности частиц смолы после 30 анализов ее следует удалять из колонки и инкубировать в 2 н. NaOH при 80°C в течение 30 мин. Закончив инкубацию, жидкость сливают и смолу сус-

пендируют в 0,2 н. NaOH. После осаждения частиц смолы надосадочную жидкость вновь сливают, а ионообменник суспендируют в буферном растворе определенной молярности в зависимости от применяемого метода. В колонку смолу вносят в этом же буферном растворе, а затем им же (тремя объемами колонки) окончательно отмывают колонку перед нанесением препарата.

4. Буферные растворы. Раствор для нанесения образца: 0,2 М NaCl в 0,01 н. HCl. *Приготовление:* 11,6 г NaCl и 0,8 мл концентрированной HCl растворяют в деионизованной дистиллированной воде в конечном объеме 1 л.

Элюирующие растворы: состав элюирующих буферных растворов приведен в табл. 8.

Таблица 8

Буферные растворы для автоматического аминокислотного анализатора

	А	Б	В	Г	Д	Е
Na ⁺ , М	0,2	0,2	0,35	0,8	0,8	1,6
pH	3,28	4,25	5,28	4,25	4,25	6,0
Конечный объем, мл	5000	5000	5000	5000	5000	5000
Лимонная кислота (одноводная), г	70,5	282,0	123,0	282,0	70,5	35,25
HCl (уд. вес 1,19), мл	61,6	167,5	32,5	167,0	41,88	—
NaOH, г	40,0	160,0	70,0	160,0	40,0	20,0
NaCl, г	—	—	—	—	175,32	438,75
Этанол, мл	200	—	—	—	—	—
Детергент (брий 35), г	10	10	10	10	10	10

Для приготовления всех растворов используется деионизованная дистиллированная вода, которую можно получить, пропуская дистиллированную воду через колонку, заполненную катионо- и анионообменниками.

Необходимо, чтобы растворы А и В имели строго определенный pH, поскольку даже небольшое изменение pH вызывает значительное ухудшение разделения. При элюировании раствором А маркером на хроматограмме может служить цистин. В идеальном случае он выходит между аланином и валином. Если же pH выше 3,28, пик цистина смещается ближе к пику аланина или даже сливается с ним. С другой стороны, если pH раствора ниже 3,28, пик цистина смещается к пику валина, перекрывает его или даже предшествует ему на хроматограмме. В первом случае буфер подкисляют добавлением 0,5—1,0 мл концентрированной HCl на 1 л раствора,

а во втором рН раствора повышают, добавляя такое же количество 50%-ного раствора NaOH. Необходимо отметить, что при подщелачивании возрастает концентрация ионов натрия, а следовательно, увеличивается молярность раствора А. При увеличении концентрации Na^+ с 0,2 до 0,25 н. пики аспарагиновой кислоты, треонина, серина, глутаминовой кислоты и пролина сливаются. При элюировании раствором В маркером служит гистидин. Если рН раствора слишком высокий, пик гистидина накладывается на пик аммиака, а если слишком низкий — увеличивается время, необходимое для элюирования. Для колонки высотой 6—8 см при скорости протекания 68 мл/ч максимальная продолжительность элюирования 1 ч.

Даже если анализатор используется непрерывно, из-за опасности размножения бактерий не следует готовить более 5 л буферных растворов. Первым признаком пророста (когда раствор еще не имеет хлопьев) является асимметрия пиков, в особенности в восходящей части, и слияние пиков аммиака и лизина при одноколоночной процедуре. При обильном проросте оба пика полностью накладываются друг на друга. Проросший раствор следует немедленно вылить, посуду тщательно отмыть сначала детергентом, а затем деионизованной водой; эту же процедуру необходимо проделать с соединительными трубками. Проросшую смолу нельзя отмывать в колонке, ее следует извлечь и промыть теплым щелочным раствором.

Небольшие колебания рН растворов Г, Д и Е не столь важны при элюировании, как изменения в концентрации ионов натрия. Если концентрацию Na^+ уменьшить на 0,05 М, расстояние между пиками аммиака, лизина, гистидина и аргинина на хроматограмме увеличивается. При увеличении концентрации ионов натрия на 0,05М аммиак выходит двоянным пиком с лизином. Концентрация ионов натрия в растворе Г зависит от качества используемой NaOH, а в растворах Д и Е — от чистоты NaCl. Судя по нашему опыту, большая часть препаратов NaCl содержит заметные количества воды, поэтому мы рекомендуем пользоваться препаратами, предварительно высушенными при 100°С в течение 6 ч.

Очень важно, чтобы растворы были свободны от аммиака. Если растворы, особенно А, содержат аммиак, то при одноколоночном методе на хроматограмме можно наблюдать так называемое «аммиачное плато», которое начинается перед пиком аммиака и кончается после пика гистидина. Чем выше это плато, тем меньше чувствительность прибора в тех пределах, где выходят пики аммиака, лизина и гистидина. Чтобы избежать высокого фона, следует применять реактивы высокой чистоты и деионизованную воду, а также запереть курение в комнате, где стоит прибор.

5. *Заполнение колонки. Заполнение малой колонки для определения основных аминокислот.* Около 15 мл смолы смешивают с

0,2 н. NaOH. После оседания частиц надосадочную жидкость декантируют, смолу суспендируют в растворе В, перемешивая при комнатной температуре 30 мин. После оседания частиц надосадочную жидкость опять декантируют и всю процедуру повторяют. Затем смолу смешивают с двумя объемами раствора В. На дно колонки на металлическую сетку кладут круглый фильтр и наливают около 2 мл раствора В. Смолу суспендируют в 2 объемах раствора В, наливают в колонку и оставляют стоять 5—10 мин. Затем к колонке подключают раствор В. Высота осевшей смолы в колонке должна быть 6—8 см. Через колонку 3 раза поочередно пропускают 0,2 н. NaOH и раствор В.

Заполнение большой колонки для разделения кислых и нейтральных аминокислот при двухколоночном методе. Для одной колонки требуется около 50 г смолы. Большая колонка заполняется так же, как и малая (описано выше), за исключением того, что вслед за обработкой щелочью смолу суспендируют в растворе А и последующую обработку в колонке также производят щелочью и раствором А.

Заполнение колонки при одноколоночном методе. При одноколоночном методе анализа в системе двух растворов эти растворы отличаются по концентрации Na^+ в 4 раза. В системе трех буферных растворов первый и третий растворы отличаются по концентрации Na^+ в 8 раз. Столь большие различия могут влиять на объем смолы в колонке, если заполнение ее вести обычным способом. Чем выше молярность раствора, тем меньше набухание и соответственно объем смолы в колонке. Поэтому если при заполнении колонки был использован первый низкомолярный буфер, а при последующей обработке применялся буферный раствор более высокой молярности, то объем смолы в колонке может заметно уменьшиться, что при повторном цикле пропускания растворов приведет к очень сильному спрессовыванию. Во избежание этого заполнение колонки проводят следующим образом.

Смолу смешивают с 0,2 н. NaOH, надосадочную жидкость декантируют, а осадок заливают раствором Г или Д при работе в двухбуферной и раствором Е при работе в трехбуферной системе. После 30 мин уравнивания жидкость декантируют, а смолу вновь суспендируют в данном растворе. После очередной декантации смолу смешивают с двумя объемами раствора и вливают в колонку, как описано выше. Важно заполнять колонку в растворе высокой молярности. После того как столбик смолы в колонке достигает 50 см, для окончательной упаковки через колонку в течение 20 мин пропускают раствор высокой молярности. Затем повторяют пропускание растворов, начиная со стартового, и этот цикл обработки продлевают еще 3 раза. Следует иметь в виду, что из-за различий в молярности продолжительность каждого цикла занимает по крайней мере 20 мин.

Благодаря высокой концентрации ионов натрия (0,8 и 1,5 н.) в используемых растворах совсем не обязательно проводить каждый раз регенерацию колонки щелочью. Обработку щелочью целесообразно производить один раз после каждых 15—20 анализов, а проведя 30 анализов, рекомендуется извлечь смолу из колонки и обработать подогретой щелочью.

6. Приготовление пробы. Гидролиз пептидов и белков. Анализируемый материал растворяют или суспендируют в 6 н. HCl, которую берут примерно в 200-кратном избытке. Через полученный кислый раствор или суспензию продувают азот и ампулу запаивают. Гидролиз продолжается 48—72 ч при 106°C, а по окончании его кислоту удаляют над КОН и P₂O₅ при 80°C в вакуумном эксикаторе.

Важно достаточно быстро удалить соляную кислоту: при медленном ее удалении возможно частичное разрушение аминокислот.

При кислотном гидролизе триптофан разрушается полностью, а серин и треонин — на 5—10%; разрушаются также цистин, цистеин и метионин. Из метионина получается главным образом метионинсульфоксид, который частично снова превращается в метионин в процессе гидролиза. Серусодержащие аминокислоты могут быть определены только в окисленных образцах (например, окисленных надмуравьиной кислотой).

Освобожденный от кислоты гидролизат растворяют в смеси 0,2 н. NaCl и 0,01 н. HCl (раствор для нанесения).

Подготовка проб сыворотки крови. Анализируемую сыворотку смешивают с сульфосалициловой кислотой (20 : 1) и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают в 5-миллилитровую колбочку. Осадок промывают двумя порциями по 1,5 мл раствора для нанесения и объем объединенной надосадочной жидкости доводят до 5,0 мл тем же раствором.

Подготовка проб мочи. К 5 мл мочи добавляют 2 н. NaOH до pH 11—12 и раствор высушивают в вакуумном эксикаторе для удаления аммиака. Сухой остаток растворяют в 10 мл раствора для нанесения.

Примечания. Физиологические жидкости — сыворотка, моча и др. — содержат как моноаминодикарбоновые кислоты, так и их амиды (аспарагин и глутамин). Их разделение требует специальных методов, обзор которых сделан Бенсоном и др. [1].

При исследовании любого материала (белкового гидролизата, физиологической жидкости, синтетического материала и др.) количество анализируемого образца в среднем должно быть 0,25—0,35 мкмоль (при длине кюветы 6,6 мм), причем нижний предел — не ниже 0,1 мкмоль, а верхний — не выше 1,0 мкмоль. Если анализатор снабжен микроспектрофотометром, то можно брать для анализа 0,05—0,075 мкмоль, а нижний и верхний пределы будут 0,001 и 0,3 мкмоль соответственно.

7. Нанесение образца. Образец можно нанести на колонку либо вручную, либо автоматически. К автоматическим устройствам для нанесения образца обычно прикладываются подробные инструкции, поэтому мы не будем здесь рассматривать автоматический способ нанесения.

Анализируемое вещество растворяют в упомянутом выше буферном растворе для нанесения, имеющем оптимальный для связывания pH. Объем образца можно варьировать, однако нанесение слишком больших объемов занимает много времени. Оптимальным, пожалуй, является объем от 0,1 до 0,5 мл. Раствор над смолой удаляют и образец вводят соответствующей пипеткой с помощью сжатого азота. Остатки наносимого образца трижды смывают со стенок колонки стартовым раствором круговыми движениями пипетки.

8. Программирование. Программирование анализа, т. е. выбор соответствующего аналитического метода, зависит от конкретной задачи. Если в лаборатории определенного профиля обычно проводят однотипные исследования, например анализы гидролизатов или физиологических жидкостей, рекомендуется ограничиться использованием какого-либо одного оптимального метода. Литература по автоматическому аминокислотному анализу очень обширна, к настоящему времени описано значительное число различных методик. Не имеет смысла перечислять все эти методики, поэтому ниже будут приведены лишь те, которые по нашему мнению наиболее удобны (фиг. 36 и 37).

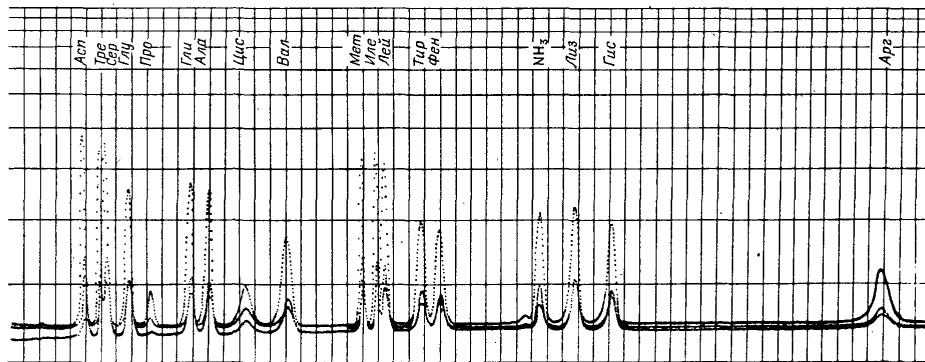
Общий анализ гидролизатов одноколоночным двухбуферным методом [2]

Высота столбика смолы в колонке	55 см
Буферный раствор 1	А
Буферный раствор 2	Г или Д
Скорость протекания буферного раствора	100 мл/ч
Скорость протекания нингидрина	50 мл/ч
Время замены буферного раствора	90 мин
Общая продолжительность анализа	240 мин
Давление буферного раствора при 55°C	18—25 атм

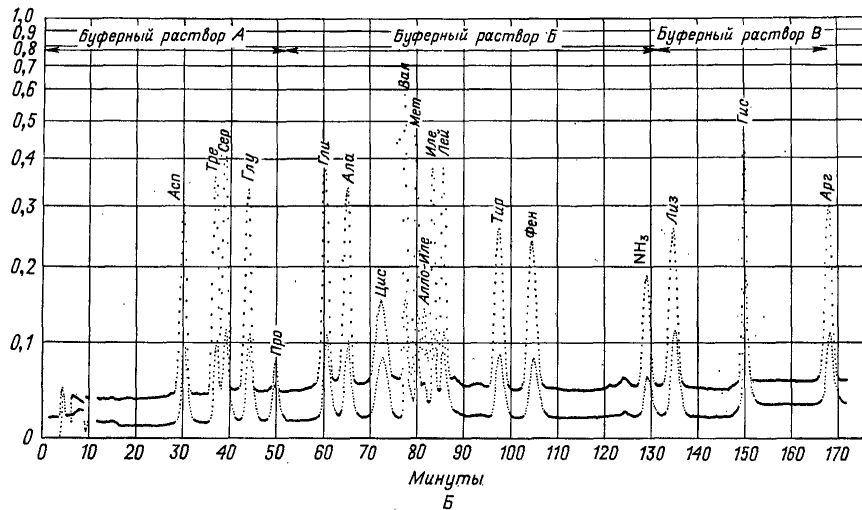
Примечания. После элюирования аргинина колонку можно регенерировать без обработки щелочью, пропуская раствор А. Щелочная обработка необходима лишь после каждых 15 анализов.

Общий анализ гидролизатов белков одноколоночным трехбуферным методом [3]

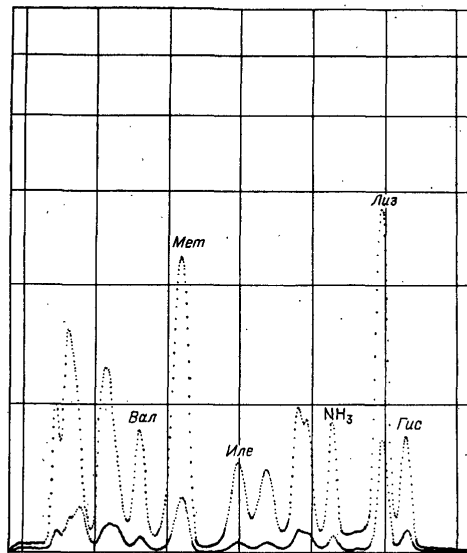
Высота столбика смолы в колонке	55 см
Буферный раствор 1	А
Буферный раствор 2	Д
Буферный раствор 3	Е
Первая смена буферного раствора	90 мин
Вторая смена буферного раствора	На восходящей части пика аммиака



A

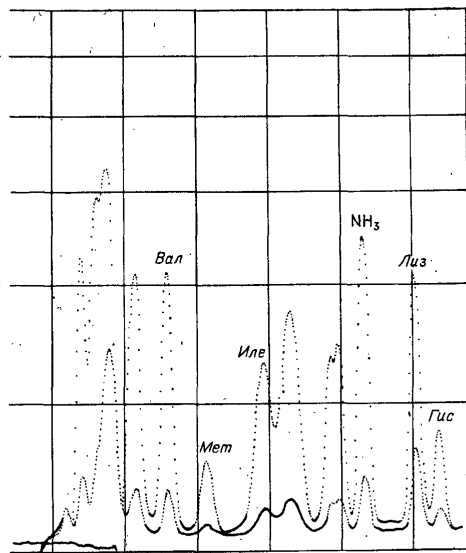


Фиг. 36. Количественное определение аминокислот на одной колонке.
 А. Двухбуферная система. Б. Трехбуферная система.

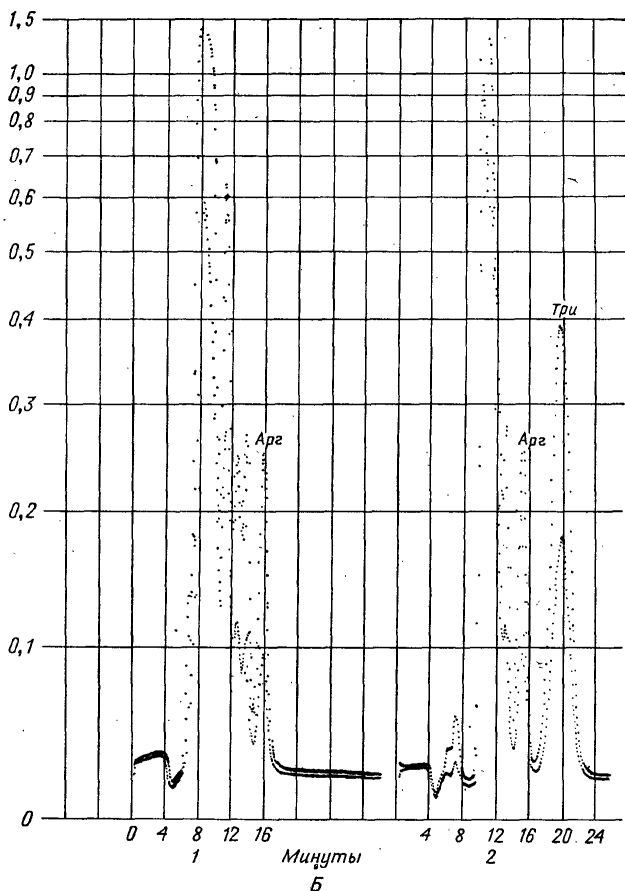


1

A



2



Фиг. 37. Хроматограммы, полученные при быстром программировании анализа аминокислот.

А. Определение Мет и Лиз. 1 — смесь, используемая для калибровки, содержащая 4-кратный избыток Мет и Лиз; 2 — кислотный гидролизат семян растений.

Б. Определение Три. 1 — смесь, используемая для калибровки, не содержащая Три; 2 — смесь, используемая для калибровки, содержащая 1 мк моль Три.

Скорость протекания буферного раствора	100 мл/ч
Скорость протекания нингидрина	50 мл/ч
Продолжительность анализа	180—190 мин
Давление буферного раствора при 55°C	30—35 атм для раствора А, 25—28 атм для раствора Д, 20—22 атм для раствора Е

Примечания. В этом случае регенерация не обязательна. Обработку щелочью проводят способом, описанным выше.

При определении кислых и нейтральных аминокислот двухколоночным методом прибору задается такая же программа, как и при одноколоночным методом, но анализ останавливают после того, как выходит пик фенилаланина.

С растворами Г и Д такой анализ проводят в течение 2 ч. Если применяют классическую методику с использованием раствора Б, это время возрастает до 3 ч, поэтому последний вариант метода вряд ли оправдан.

После анализа колонку следует регенерировать 0,2 н. NaOH и отмыть стартовым буферным раствором (А).

Определение основных аминокислот на малой колонке [5]

Высота столбика смолы в колонке	8—10 см
Буферный раствор	В
Скорость протекания буферного раствора	68 мл/ч
Скорость протекания нингидрина	34 мл/ч
Давление буферного раствора при 55°C	4—8 атм
Продолжительность анализа	около 80 мин

Примечания. Продолжительность анализа зависит от высоты смолы в колонке. Регенерация необходима только после 10—15 анализов.

Быстрое определение метионина и лизина [4]

Высота смолы в колонке	14 см
Буферные растворы	А и Г
Скорость протекания буферного раствора	100 мл/ч
Скорость протекания нингидрина	50 мл/ч
Давление буферного раствора при 55°C	8—12 атм
Продолжительность анализа, включая регенерацию	75 мин
Программирование	0—25 мин раствор А, 25—62 мин раствор Г, 62—63 мин 0,2 н. NaOH, 63—73 мин раствор А

Примечания. Во многих случаях, прежде всего при селекции растений и оценке кормов, бывает достаточно определить содержание лишь метионина и лизина. Метод быстрого анализа позволяет выполнить целую серию ориентировочных опытов. На малой колонке в анализаторе с приведенной выше программой метионин выходит отдельным пиком между пиками валина и изолейцина, а пик лизина — между пиками аммиака и гистидина.

9. Оценка результатов. В инструкции к прибору обычно описано, как нужно производить оценку хроматограммы, поэтому мы не рассматриваем здесь этот вопрос.

10. Источники ошибок. Автоматический аминокислотный анализатор — довольно сложный прибор; при работе с ним следует

иметь в виду, что возможны артефакты, обусловленные следующими причинами: а) механическими неполадками прибора, б) химическими факторами, в) неточностью в работе.

Очевидно, основные источники ошибок могут быть различными в разных лабораториях и для разных типов приборов, поэтому ниже мы обратим внимание лишь на ошибки более общего характера.

Наблюдаемые неполадки

Возможная причина

Пики Асп, Тре, Сер, Глу накладываются друг на друга

Колонка неправильно уравновешена буфером слишком высокой концентрации).

Пики Глу и Про перекрываются или меняются местами

Нарушения в системе, поддерживающей температуру колонки, температура занижена.

Асимметричные пики

Повышенное давление на смолу буферного раствора.

Загрязнение смолы тяжелыми металлами (смолу следует извлечь из колонки и промыть ЭДТА и кислотой).

Размножение бактерий (необходима обработка горячей щелочью).

Загрязнение белком (необходима обработка горячей щелочью).

Нестабильная линия фона, «рыбросы» на хроматограмме при каждой длине волны

Пузырьки воздуха или плавающие частицы в проточной кювете (например, гранулы смолы).

Не закреплены держатели кюветы в спектрофотометре.

Неполадки в электронной схеме самописца (в усилителе).

Периодические изменения (погашение и понижение) линии фона
Внезапное падение давления буферного раствора

Нарушение работы насоса, утечка в кранах.

Нарушения в системе подачи буферного раствора: а) пузырьки воздуха в насосе, б) прокол в подающем шланге, в) утечка в клапане насоса, г) резиновые прокладки износились или повреждены.

Внезапное падение давления раствора нингидрина

Воздух в насосе, подающем нингидрин (нингидрин израсходован); прокол в соединительном шланге.

Линии фона при длине волны 570 и 440 нм поменялись местами

Изменилось соотношение элюат — нингидрин; один из насосов плохо работает.

На самописце появляется прерывистая линия

Плохие контакты в электронной системе ламп; окислились контакты микропереключателя самописца.

Появление на хроматограмме необычного пика; чаще всего новые компоненты появляются перед аммиаком и аргинином

Загрязнен буферный раствор для нанесения.

Повышение линии фона между пиками аммиака и гистидина

Аммиак в буферном растворе; загрязненная дистиллированная вода.

Пики слишком низкие

Обесцветился нингидрин (реокисле-

Пики аммиака и лизина перекрываются	ние); «устарели» лампы; сильно загрязнена смола. Сильно загрязнена смола; испорчен клапан между сосудами с буферными растворами 2 и 3
Нет цветной реакции	Неполадки в системе, обеспечивающей поддержание необходимой температуры реакционной смеси; нет нингидрина.

Цитированная литература

1. *Benson J. V., Gordon M. J., Patterson J. A.*, Anal. Biochem., **18**, 228 (1967).
2. *Dévényi T.*, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., **3**, 429 (1968).
3. *Dévényi T.*, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., **4**, 297 (1969).
4. *Dévényi T.*, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., **6**, 129 (1971).
5. *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, Anal. Chem., **30**, 1181 (1958).

Глава VII

ХРОМАТОГРАФИЯ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ НА БУМАГЕ

Принцип метода. Благодаря различиям в коэффициентах распределения аминокислоты и пептиды можно разделить с помощью насыщенных водой органических растворителей на фильтровальной бумаге в закрытой камере соответствующей формы и размеров.

Область применения. Качественное и полуколичественное определение аминокислот, получение пептидных карт (метод отпечатков пальцев), микропрепаративное разделение и очистка пептидов.

МЕТОДИКА

1. Хроматографическая камера. Для восходящей хроматографии, при которой фронт растворителя движется вверх по бумаге, можно использовать стеклянный цилиндр подходящего размера. Максимальные размеры листа бумаги примерно 45×50 см, поэтому высота такого цилиндра должна быть немного больше 50 см. Лист бумаги сворачивают в повторяющий форму цилиндра рулон. Для сохранения этой формы два конца листа сшивают нейлоновой нитью. Обычно диаметр рулона не превышает 12—15 см. При таких размерах в одном и том же стеклянном цилиндре можно либо провести анализ материала методом «отпечатков пальцев», либо получить одномерные хроматограммы 8—10 разных образцов одновременно.

Нанеся на края цилиндра слой вакуумной смазки, его закрывают стеклянной пластинкой, которую сверху придавливают каким-нибудь грузом, например заполненной жидкостью бутылкой. В таком герметично закрытом цилиндре удастся создать атмосферу равномерно насыщенных паров растворителя. Она поддерживается за счет испарения жидкости, налитой в 50-миллилитровый сосуд, который ставят на дно цилиндра внутрь рулона. Следует позаботиться о том, чтобы бумага не касалась ни стенок цилиндра, ни краев сосуда с уравнивающей жидкостью, иначе в местах контакта фронт растворителя изменит скорость своего движения.

Для одновременного получения нескольких хроматограмм в одинаковых условиях более пригодна прямоугольная камера, которую можно использовать как для восходящей, так и для нисходящей хроматографии. В качестве такой камеры можно использовать, например, деревянный ящик со стеклянными стенками размером $70 \times 70 \times 70$ см, по верхнему краю которого прикреплена полоска пористой резины. Сверху эту камеру накрывают толстым (тяжелым) стеклом, обеспечивающим герметичность системы. При восходящей хроматографии нижний край фильтровальной бумаги зажимают между двумя стеклянными палочками, погруженными в одну из стеклянных кювет, которые размещают на дне камеры. Для нисходящей хроматографии необходимы пластмассовые или стеклянные кюветы. Верхний край фильтровальной бумаги погружают в такую кювету, расположенную в верхней части камеры, и закрепляют там с помощью тяжелой стеклянной палочки.

В продаже имеются хроматографические камеры подобной конструкции, которые можно использовать для самых разнообразных целей.

2. *Выбор фильтровальной бумаги.* Для качественного и количественного хроматографического анализа обычно используют бумагу Шляйхер-Шуль 20436 и Ватман 1. Микропрепаративное выделение пептидов лучше всего проводить на бумаге Ватман 3 и Ватман 3 ММ. Наиболее четкая картина пептидных карт получается на бумаге Ватман 3 ММ.

При микропрепаративном выделении следует обратить особое внимание на способ элюирования фракций. Бумага Ватман позволяет проводить элюирование дистиллированной водой, поэтому фон в измеряемых пробах довольно низкий. В то же время элюиро-

Таблица 9

Состав стандартных растворов аминокислот

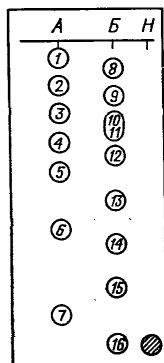
Раствор А	Концентрация, мг/10 мл	Раствор Б	Концентрация, мг/10 мл
Цистеиновая кислота	70	Лизин	59
Гистидин	62	Аргинин	69
Аспарагиновая кислота	53	Серин	42
Глицин	30	Глутаминовая кислота	59
Треонин	47	Аланин	35
Пролин	46	Метининсульфон	59
Тирозин	72	Лейцин	54
Валин	46		
Фенилаланин	55		

вание фракций при хроматографии на бумаге Шляйхер-Шуль можно проводить только разбавленным раствором уксусной кислоты, что приводит к весьма высокому фону.

3. *Стандартные растворы аминокислот.* При качественной и полуколичественной хроматографии аминокислот используют два стандартных раствора, состав которых приведен в табл. 9. Из-за

Фиг. 38. Расположение аминокислот на бумаге при нисходящей хроматографии в бутанольной системе.

А и Б — смеси аминокислот; Н — нейтральный красный;
1 — Цис SO_3H ; 2 — Гис; 3 — Асп; 4 — Гли; 5 — Тре; 6 — Про; 7 — Фен; 8 — Лиз; 9 — Арг; 10 — Met SO_3 ; 11 — Сер; 12 — Глу; 13 — Ала; 14 — Тир; 15 — Вал; 16 — Лей.



нестабильности цистеина, цистина и метионина вместо них в состав стандартных растворов входят окисленные производные, т. е. цистеиновая кислота и метионинсульфон.

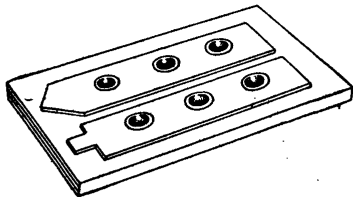
Относительное расположение различных аминокислот при хроматографии стандартных аминокислотных смесей показано на хроматограмме, представленной на фиг. 38. В пятне, обозначенном буквой Н, содержится нейтральный красный. Этот индикатор имеет идентичную с лейцином величину R_f , и поэтому по нему можно следить, когда наиболее быстро мигрирующий компонент стандартной смеси — лейцин — достигнет нижнего края хроматограммы при нисходящей хроматографии.

4. *Нанесение исследуемого образца.* Исследуемый образец можно нанести на хроматографическую бумагу микропипеткой, градуированным капилляром или с помощью так называемого метода полиэтиленовой пленки.

При полуколичественном анализе на хроматографическую бумагу необходимо наносить точно известный объем исследуемого раствора. Проще всего и наиболее точно это можно сделать с помощью микропипетки. В продаже имеются микропипетки нескольких типов с постоянным или произвольно задаваемым объемом. В связи с тем что фабрично изготовленные микропипетки довольно дороги, ис-

следователи часто пользуются самодельными капиллярами, которые можно приготовить следующим образом.

Из расплавленных на огне стеклянных трубок или пробирок вытягивают тонкие капилляры длиной около 12 см и производят их калибровку на 0,05 или 0,01 мл. Обезжиренные и хорошо высушенные капилляры калибруют с помощью градуированной микропипетки



Фиг. 39. Полоски полиэтиленовой пленки с исследуемыми образцами.

Образцы наносят в стартовой области хроматограммы с помощью капиллярной пипетки или в виде отпечатка.

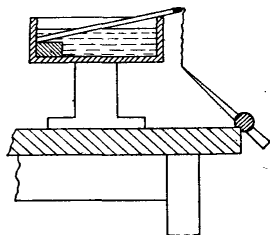
на 0,1 мл. Для этого из микропипетки в капилляр переносят точно 0,05 или 0,01 мл воды и на стенке капилляра карандашом по стеклу или цветной пастой отмечают положение мениска. Обладая некоторым опытом, можно довольно точно произвести эту калибровку. Важно проследить, чтобы конец пипетки был достаточно чистым, сам капилляр — обезжиренным и чтобы во время переноса воды и

капилляр, и микропипетка находились в горизонтальном положении.

При своеобразном способе нанесения исследуемого материала на хроматографическую бумагу с помощью полиэтиленовой пленки дном нагретой на пламени стеклянной пробирки в пленке делают несколько углублений, в которые вносят примерно по 0,05 мл исследуемого материала, например кислотного гидролизата белка. На одной пленке можно разместить 3—5 проб (фиг. 39). Очень осторожно, остерегаясь размазать капли, пленку переносят для высушивания в вакуумный эксикатор. Примерно через 10—15 мин, когда капли подсохнут, пленку извлекают и на край каждого высохшего пятна наносят маленькую каплю воды заостренным концом стеклянной палочки, с помощью которой растворяют весь материал в этой капле. Лист хроматографической бумаги кладут на чистое стекло и отмечают карандашом места нанесения материала. Затем к этому участку бумаги прикладывают полиэтиленовую пленку с исследуемым материалом и с обратной стороны прижимают ее к бумаге пальцем. Если при этом площадь смоченной бумаги будет не больше 1 см², то в результате хроматографии исследуемый материал распределится небольшими пятнами правильной формы. Этот метод нанесения обладает большими преимуществами: в течение нескольких минут можно без потерь нанести 20—30 образцов. При этом отпадает необходимость готовить и мыть капилляры, применять при нанесении высушивание горячим воздухом и т. д.

5. *Микропрепаративная хроматография.* Подлежащий фракционированию материал наносят на бумагу Ватман 3 или Ватман 3 ММ вдоль стартовой линии, длина которой не должна превышать 20 см. Максимально можно наносить 3—4 мг на 10 см. По окончании хроматографии хроматограмму высушивают, отрезают с обеих сторон полоски бумаги шириной 0,5 см и окрашивают их для того, чтобы установить положение зон, которые должны быть элюированы (см. фиг. 17); затем вырезают эти зоны и элюируют фракции.

Фиг. 40. Элюирование компонентов из фильтровальной бумаги малыми объемами растворителя с помощью капилляра (подробное объяснение см. в тексте).



Для элюирования один конец вырезанного участка зажимают между двумя стеклянными пластинками, погруженными в кювету с дистиллированной водой, и, когда вся бумага увлажнится, к нижнему заостренному концу подводят закрепленный пластилином капилляр. Элюат начинает медленно поступать в капилляр (фиг. 40). Если длина капилляра равна 30 см, то заполняющий его объем жидкости вполне достаточен для элюирования полоски хроматограммы, имеющей размер 1×8 см. Из капилляра элюат переносят в маленький бюкс на 2—3 мл для высушивания в вакуумном эксикаторе.

Независимо от избранного способа нанесения образца (с использованием микропипетки, капилляра или полиэтиленовой пленки) исследуемый материал должен быть как можно более концентрированным и распределяться на минимальной площади. При слишком большом диаметре стартового пятна или при слишком широкой зоне нанесения материала на одномерной препаративной хроматограмме довольно трудно получить хорошее разделение, так как при этом фракции будут давать большие пятна и зоны, а расположенные рядом компоненты могут перекрывать друг друга. Идеальным было бы нанесение образца в виде точки. Это, конечно, вряд ли возможно, но, если стартовое пятно в диаметре не превышает 5—6 мм, а стартовая зона не шире 2—3 см, получаются вполне четкие хроматограммы. Очень часто при нанесении трудно обойтись без специальных приспособлений, таких, например, как столик для нанесения образцов, имеющийся в продаже. Для подсушивания

проб при нанесении проще всего использовать обыкновенный фен для сушки волос. Горячий воздух, направляемый на бумагу, быстро высушивает содержащуюся в нанесенном материале воду. Это позволяет повторять нанесение, не увеличивая диаметра стартового пятна больше, чем на несколько миллиметров и ширины стартовой зоны больше, чем на несколько сантиметров.

6. Растворители. В литературе описано очень много самых разных растворителей, используемых для качественного и полуколичественного анализа, а также для микропрепаративных целей. Здесь мы приводим только те из них, которые можно успешно применять во многих случаях.

Бутанол — вода — уксусная кислота (120:50:30) (по объему; однородная система, не требующая уравнивающего раствора)

Изоамиловый спирт — пиридин — вода (35:35:30) (по объему; однородная система, не требующая уравнивающего раствора)

С равным успехом этот растворитель можно использовать при качественном и полуколичественном анализе аминокислот, при микропрепаративном разделении и при получении пептидных карт. Свежеприготовленный растворитель можно использовать немедленно; его не следует хранить свыше 10—12 дней, так как по истечении этого срока происходит этерификация.

Вначале смешивают изоамиловый спирт с пиридином и к этой смеси по каплям при постоянном перемешивании добавляют воду. Если полученный раствор опалесцирует, его следует профильтровать. Опалесценция вновь появляется через 8—10 дней и тогда растворитель становится негодным для использования. Это одна из лучших смесей для получения пептидных карт и микропрепаративных хроматограмм.

Приведенные ниже растворители можно использовать при комбинации электрофоретического и хроматографического разделения исследуемого материала: бутанол—пиридин—уксусная кислота — вода (60 : 40 : 12 : 48); вода, насыщенная фенолом, в атмосфере NH_3 ; втор-бутиловый спирт — 3%-ный раствор аммиака (3 : 1); *m*-крезол — фенол, насыщенный водой (1 : 1); изобутанол—вода—муравьиная кислота (695 : 295 : 10); изобутанол—метилэтилкетон — вода (40 : 30 : 20); *n*-пропанол—вода (70 : 30); этанол—вода (77 : 23).

7. Идентификация аминокислот и пептидов во фракциях. А. Нингидриновая реакция. Нингидрин реагирует со всеми аминокислотами, имеющими α - NH_2 -группу, давая фиолетовое окрашивание, за исключением пролина или оксипролина, в реакции с которыми нингидрин дает желтое окрашивание. Некоторые примеси (медь, кадмий и др.) могут влиять на цвет пятен. Для проявления хрома-

тограмм весьма удобен так называемый кадмий-нингидрин, реакция которого с аминокислотами довольно чувствительна и приводит к развиготной стойкой красной окраски, а также коллидин-нингидрин, реагирующий с некоторыми аминокислотами избирательно и позволяющий дифференцировать их по цвету пятна.

1) *Приготовление кадмий-нингидрина.* 1,0 г нингидрина растворяют в 100 мл ацетона. 100 мл ацетата кадмия растворяют в 10 мл дистиллированной воды и прибавляют 5 мл уксусной кислоты. Оба полученных раствора объединяют и хранят в склянке из темного стекла.

Высушенную хроматограмму проводят через приготовленный раствор красителя, налитый в плоскую кювету, и высушивают на воздухе в темноте. При комнатной температуре максимальное окрашивание развивается приблизительно через 2 ч.

2) *Приготовление коллидин-нингидрина.* 5,0 г нингидрина растворяют в 955 мл ацетона, затем добавляют 25 мл уксусной кислоты и 20 мл коллидина.

Б. *Определение гистидина при помощи реакции Паули.*

1) *Приготовление реактива Паули.* Раствор I: 50,0 г сульфаниловой кислоты растворяют в 250 мл 10 %-ного раствора KOH и добавляют 200 мл 10 %-ного раствора NaNO_2 . Раствор II: к 80 мл концентрированной HCl прибавляют 40 мл дистиллированной воды.

К охлажденному до 0°C раствору II по каплям при охлаждении и постоянном перемешивании прибавляют раствор I. выпадающий при этом осадок отфильтровывают и высушивают при комнатной температуре.

2) 0,1 г реактива Паули растворяют в 100 мл 20 %-ного раствора Na_2CO_3 и свежеприготовленным раствором опрыскивают хроматограмму. Чтобы водно-щелочной раствор не размывал пятен и зон на хроматограмме, следует добиться тонкодисперсного распыления реактива и равномерного опрыскивания. Пептиды, содержащие гистидин, и свободный гистидин дают красное окрашивание на желтом фоне. Пептиды, содержащие тирозин, и свободный тирозин дают фиолетовое или серо-голубое окрашивание, но их пятна в отличие от пятен, содержащих гистидин, быстро бледнеют.

В. *Определение аргинина и пептидов, содержащих аргинин, в реакции Сакагуши.* Раствор I: 0,01 %-ный α -нафтол в 95 %-ном этаноле, содержащем 5 % мочевины. Раствор II: 2,0 г брома в 100 мл 8 %-ного раствора NaOH. Перед использованием к раствору I добавляют несколько гранул NaOH и после их растворения реактивом опрыскивают хроматограмму. Затем бумагу высушивают и опрыскивают раствором II. Аргинин и пептиды, содержащие аргинин, окрашиваются в красный цвет.

Г. *Определение пролина и оксипролина.* 100 мг изатина растворяют в 50 мл бутанола и прибавляют 5 мл уксусной кислоты. Проявляемую хроматограмму опрыскивают этим раствором и

высушивают при 40°C в течение 5 мин. Пролин и пептиды, содержащие пролин в N-концевом положении, дают интенсивное голубое окрашивание. Фенилаланин и тирозин при этом окрашиваются в зеленовато-голубой цвет, что является помехой при определении пролина и оксипролина.

Д. Определение триптофана. 0,5 г *n*-диметиламинобензальдегида растворяют в 100 мл 95%-ного этанола, содержащего 2 мл концентрированной HCl. С полученным раствором триптофан дает фиолетовое окрашивание.

Е. Определение тирозина. 0,1 г α -нитрозо- β -нафтола растворяют в 100 мл 75%-ного этанола. После опрыскивания этим раствором хроматограмму высушивают и опрыскивают 10%-ным раствором азотной кислоты. Затем ее опять высушивают и в течение 3 мин выдерживают при 90°C. Тирозин и пептиды, содержащие тирозин, дают красное окрашивание на бледно-зеленом фоне.

Ж. Определение глицина. 1) 0,2 г фталевого альдегида растворяют в 100 мл ацетона; 2) 1,0 г КОН растворяют в 100 мл 96%-ного этанола.

Хроматограмму проводят через раствор 1 и высушивают при 100°C, затем проводят через раствор 2 и опять 10 мин сушат при 100°C. В результате реакции глицин дает зеленое окрашивание.

З. Определение N-ацилпроизводных и крупных пептидов в реакции с хлором. Сухую хроматограмму или электрофореграмму в течение 30 мин выдерживают в стеклянном цилиндре в атмосфере хлора, затем извлекают из цилиндра и опрыскивают 1%-ным раствором крахмала, содержащим 1% KI. Соединения с пептидными связями в молекуле проявляются темносиними зонами или пятнами.

Рекомендуемая литература

Zweig G., Whitaker J. R., Paper Chromatography and Electrophoresis. Vol. II, Academic Press, New York, London, 1971.

Глава VIII

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПЕПТИДОВ

А. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КИСЛЫХ ПЕПТИДОВ НА КОЛОНКЕ С АМБЕРЛИТОМ IR-4B

Принцип метода. Анионообменная смола амберлит IR-4B, используемая в ацетатной форме, при значениях pH раствора между 5 и 6 связывает фракцию пептидов, обладающих сильнокислотными свойствами, которая может быть затем элюирована в обмен на ионы Cl^- .

Область применения. Эта смола используется в основном для фракционирования небольших пептидов и выделения кислых аминокислот и пептидов из смеси.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление колонки со смолой.* Для связывания 15 мг дикарбоновой кислоты необходимо около 3,0 г сухой смолы. Смолу (200—400 меш) суспендируют в 0,2 н. уксусной кислоте и оставляют для оседания. Неосевшие мелкие частицы смолы декантируют, а набухшую смолу суспендируют вновь, нагревают до 60° С и перемешивают в течение 1 ч. После декантации смолу 4—5 раз промывают дистиллированной водой и снова нагревают в 0,2 н. уксусной кислоте до 60° С. Смесь перемешивают в течение 1 ч, надосадочную жидкость декантируют, а смолу дважды промывают 0,2 н. уксусной кислотой. После этого суспензию отмывают дистиллированной водой до тех пор, пока pH не станет нейтральным. Приготовленной суспензией смолы заполняют колонку размером 0,5×30 см.

2. *Хроматография.* Фракционируемый материал растворяют с таким расчетом, чтобы 15 мг содержалось примерно в 30—40 мл растворителя, pH раствора подводят до 5—6 и раствор медленно наносят на колонку. После нанесения образца через колонку пропускают равный объем дистиллированной воды, а затем начинают элюирование 0,1 н. HCl. Скорость элюирования должна быть примерно вдвое меньше скорости нанесения фракционируемого материала. Вытекающий с колонки элюат собирают фракциями в пробирки по 1 мл. За ходом элюирования можно следить с помощью нингидриновой реакции, которую ставят с аликвотами фракций на фильтровальной бумаге: начиная с 11-ой пробирки 1 каплю каждой фракции

наносят на лист бумаги Ватман 3, высушивают и проявляют 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Элюирование продолжают до тех пор, пока в отбираемых аликвотах перестанет появляться окраска.

Полученные фракции либо высушивают в вакуумном эксикаторе над КОН или P_2O_5 , либо лиофилизируют.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Применяя градиентное элюирование, можно добиться дальнейшего разделения полученной фракции кислых компонентов.

2. Смолу регенерируют так же, как и перед заполнением колонки.

3. Элюат, полученный в результате промывания колонки дистиллированной водой после нанесения материала перед элюированием 0,1 н. HCl, содержит нейтральные и основные компоненты фракционируемой смеси пептидов.

Б. ХРОМАТОГРАФИЯ ОСНОВНЫХ ПЕПТИДОВ НА КОЛОНКЕ С АМБЕРЛИТОМ IRC-50

Принцип метода. Основные пептиды связываются катионообменной смолой амберлит IRC-50 (H^+), а затем могут быть элюированы при повышении концентрации H^+ и тем самым отделены от нейтральных и кислых пептидов, которые не связываются смолой.

Область применения. Фракционирование пептидов при биохимических исследованиях.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление смолы.* Смолу амберлит IRC-50 (200—400 меш) суспендируют в 0,2 н. уксусной кислоте, оставляют для оседания, а затем декантируют надосадочную жидкость. Влажный осадок суспендируют в 5 объемах 0,2 н. уксусной кислоты и нагревают до 60° С. Через 30 мин суспензию охлаждают, надосадочный слой декантируют и вновь повторяют прогревание в уксусной кислоте. После этого смолу отмывают дистиллированной водой (большими объемами) до нейтральной реакции.

Обработанной смолой заполняют колонку 2×30 см и промывают дистиллированной водой. В смеситель для градиентного элюирования заливают 150 мл дистиллированной воды, в резервуар — 0,2 н. уксусную кислоту и начинают наносить на колонку фракционируемый препарат.

2. *Хроматография.* Фракционируемый препарат готовят, как указано выше (см. хроматографию на амберлите IR-4B, стр. 195), подводят его рН до 5—6 и медленно наносят на колонку. После

нанесения смолу промывают одним объемом дистиллированной воды, затем присоединяют прибор для градиентного элюирования, включают магнитную мешалку и начинают элюирование. Элюат собирают фракциями по 1 мл с помощью автоматического коллектора. За ходом элюирования следят по нингидриновой реакции, которую проводят на фильтровальной бумаге с каплями элюата, отбираемыми из каждой фракции.

Полученные фракции высушивают в вакуумном эксикаторе и анализируют с помощью электрофореза на бумаге. Фракции, обладающие одинаковой электрофоретической подвижностью, объединяют.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Если элюирование основных пептидов происходит слишком быстро, т. е. они выходят практически одной большой фракцией, следует сделать градиент концентрации H^+ более «пологим». Для этого можно либо увеличить объем смесителя, либо уменьшить концентрацию уксусной кислоты.

2. При промывании колонки дистиллированной водой после нанесения образца перед началом элюирования кислотой выходит весьма разбавленный элюат, содержащий нейтральные и кислые компоненты смеси пептидов.

В. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ НА КОЛОНКЕ С ДАУЭКСОМ 50×2 В НЕЛЕТУЧИХ БУФЕРНЫХ РАСТВОРАХ

Принцип метода. Дауэкс 50×2 со сниженным количеством перекрестных сшивок в Na^+ - или NH_4^+ -форме связывает пептиды, состоящие из 2—20 аминокислотных остатков. Постепенно увеличивая pH и ионную силу подаваемого на колонку раствора, можно избирательно элюировать связанные пептиды.

Область применения. Препаративное разделение пептидов, анализ последовательности аминокислот в полипептидах и белках.

МЕТОДИКА

1. *Приготовление буферных растворов¹.* Аммонийформатный буферный раствор pH 3,08 : 0,75 н. муравьиная кислота + 0,2 н. NH_4OH .

Аммонийацетатный буферный раствор pH 5,06:1,47 М уксусная кислота + 1 н. NH_4OH .

¹ Указанная молярность соответствует конечной концентрации данного компонента буферного раствора.

Натрийцитратный буферный раствор pH 3,1 : 0,1 М лимонная кислота + 0,2 н. NaOH + 0,138 н. HCl.

Натрийцитратацетатный буферный раствор pH 5,1 (1 н. Na⁺): 0,25 М лимонная кислота + 0,179 н. уксусная кислота + 0,57 н. NaOH + 0,5 н. ацетат натрия.

Натрийцитратацетатный буферный раствор pH 5,1 (2 н. Na⁺): 0,5 М лимонная кислота + 0,358 н. уксусная кислота + 1,14 н. NaOH + 1 н. ацетат натрия.

Натрийцитратацетатный буферный раствор pH 4,3: разбавленный в 5 раз буферный раствор pH 5,1 + 0,2 н. буферный раствор pH 3,1 (1:1).

2. *Подготовка смолы.* а) *Получение смолы в Na⁺-форме.* Смолу суспендируют в 0,25 н. HCl и перемешивают сначала при комнатной температуре, а затем при 60—70° С в водяной бане. Через 60 мин перемешивания суспензию охлаждают до комнатной температуры, надсадочную жидкость удаляют, смолу трижды отмывают дистиллированной водой и суспендируют в 0,25 н. NaOH. Полученную суспензию снова нагревают до 60—70° С в водяной бане с перемешиванием в течение 1 ч, затем охлаждают и отмывают дистиллированной водой до нейтральной реакции.

б) *Получение смолы в NH₄⁺-форме.* Сначала смолу отмывают щелочью, затем кислотой. Отмытую от хлоридов смолу в H⁺-форме суспендируют в 0,25 н. NH₄OH, перемешивают при 60—70° С в течение 1 ч и отмывают до нейтральной реакции дистиллированной водой.

3. *Заполнение колонки.* В колонку размером 1,8 × 150 см, снабженную термостатирующей рубашкой, заливают немного буферного раствора pH 3,1. Смолу суспендируют в том же буферном растворе, подогретом до 50° С, и после тщательного перемешивания освобожденную от воздуха под вакуумом суспензию загружают в колонку. Следует заполнять колонку таким образом, чтобы над смолой всегда оставалось немного буферного раствора, обеспечивающего свободное оседание частичек смолы. Заполнение заканчивают, когда уровень смолы окажется на 10 см ниже верхнего конца термостатирующей рубашки.

4. *Нанесение препарата.* Около 200 мг фракционируемой смеси пептидов растворяют в 25—30 мл дистиллированной воды, муравьиной кислотой подводят pH раствора до 2, затем добавляют 25—30 мл буферного раствора pH 3,1 и наносят на колонку.

5. *Хроматография.* Пептиды фракционируют с помощью градиентного элюирования. Стартовый буферный раствор имеет pH 3,1. Смесь содержит 2500 мл 0,5 н. буферного раствора pH 5,1. Элюат, вытекающий из колонки, собирают фракциями по 10 мл. Нингидриновую реакцию ставят либо непосредственно с полученным элюатом, либо после его щелочного гидролиза.

Щелочной гидролиз. Из каждой фракции отбирают по 0,3 мл, перемешивают с 1 мл 2,5 н. раствора NaOH и инкубируют при 90° С в водяной бане 2,5 ч. За это время концентрация препаратов увеличивается. К каждой пробе прибавляют по 1 мл 30%-ной уксусной кислоты и проводят нингидриновую реакцию следующим образом.

В пробирки со сконцентрированными препаратами добавляют по 0,25 мл 0,2 М цитратного буферного раствора pH 5, содержащего 0,2% SnCl_2 , смесь перемешивают, затем к ней добавляют по 0,25 мл 4%-ного раствора нингидрина в пропанолe, помещают на 10 мин в кипящую водяную баню и охлаждают. В каждую пробирку добавляют по 3 мл 50%-ного пропанолa, тщательно перемешивают и колориметрируют при 570 нм.

Из фракций элюата, соответствующих вершинам пиков, отбирают пробы и электрофорезом или методом «отпечатков пальцев» определяют их гомогенность. Если фракция негомогенна, ее подвергают рехроматографии.

Относительно рехроматографии вряд ли можно дать какие-либо определенные рекомендации. Ее условия определяются конкретным составом, а также химическими и физическими свойствами анализируемого материала. Однако, по-видимому, наиболее целесообразно вести рехроматографию на смоле в NH_4^+ -форме в буферных растворах, содержащих ион аммония, так как в этих случаях полученные фракции содержат летучие соли и одновременно с концентрированием происходит обессоливание. Если, например, фракции элюируют аммонийацетатным буферным раствором, их сначала высушивают под вакуумом при 50° С, а затем растворяют в нескольких каплях дистиллированной воды и лиофилизируют.

Г. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ НА КОЛОНКЕ С ДАУЭКСОМ 50×2 В ЛЕТУЧИХ БУФЕРНЫХ РАСТВОРАХ

Принцип метода. Ионообменная хроматография проводится в летучих буферных растворах, что позволяет избежать специальных стадий обессоливания фракций.

Область применения. Препаративное фракционирование пептидов, микроструктурный анализ белков и полипептидов.

МЕТОДИКА

1. **Подготовка колонки.** Смолу дауэкс 50×2 переводят в H^+ -форму и в течение 1 ч перемешивают в 0,2 М пиридинформатном буферном растворе pH 3,1. Затем смолу загружают в колонку и промывают тем же самым буферным раствором, до тех пор пока pH вытекающего раствора не станет 3,1.

2. *Приготовление буферных растворов.* Для приготовления буферного раствора pH 3,1 смешивают 16 мл пиридина, 32 мл муравьиной кислоты и 950 мл дистиллированной воды.

Для приготовления буферного раствора pH 5,1 смешивают 158 мл пиридина и 110 мл уксусной кислоты и добавляют к смеси дистиллированную воду до конечного объема 1 л.

3. *Нанесение препарата.* Около 100 мг фракционируемого материала растворяют в 5 мл 0,2 М муравьиной кислоты и наносят на колонку.

4. *Хроматография.* С помощью автоматического коллектора собирают фракции по 2 мл. Элюирование начинают буферным раствором pH 5,1, а после 150-й фракции начинают градиентное элюирование. В смеситель заливают 500 мл буферного раствора pH 3,1, а в резервуар — буферный раствор pH 5,1.

Из каждой фракции отбирают по 0,2 мл элюата, проводят щелочной гидролиз и затем ставят нингидриновую реакцию (см. стр. 199).

Д. ХРОМАТОГРАФИЯ ПЕПТИДОВ НА КОЛОНКЕ С КМ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

Принцип метода. Группы — CH_2COOH КМ-целлюлозы проявляют слабые катионообменные свойства.

Область применения. Фракционирование крупных пептидов для аналитических или микропрепаративных целей.

МЕТОДИКА

1. *Выбор КМ-целлюлозы подходящего типа.* В продаже имеется несколько типов КМ-целлюлозы. Их можно классифицировать как волокнистые, микрогранулярные и сферические. Волокнистая КМ-целлюлоза, как и другие препараты такого рода, весьма неудобна в работе. Процесс заполнения колонки ею слишком длителен, скорость элюирования с такой колонки мала, и, кроме того, основное неудобство при работе с волокнистой КМ-целлюлозой заключается в том, что ионообменник можно регенерировать только вне колонки. Микрогранулярная КМ-целлюлоза (например, препарат CM 32 фирмы Whatman) имеет ряд преимуществ: этот ионообменник обладает очень хорошей разделяющей способностью и с ним очень удобно работать. Сферическая КМ-целлюлоза, которая производится фирмой Reanal (Венгрия), обеспечивает стабильность скорости протекания жидкости через колонку и может быть регенерирована непосредственно в колонке.

2. *Обработка КМ-целлюлозы.* Независимо от микроструктуры КМ-целлюлозу обрабатывают следующим образом: сначала ее 30 мин перемешивают при комнатной температуре в 15-кратном (сухой вес/объем) избытке 0,5 н. NaOH, затем оставляют суспензию для

отстаивания или фильтруют и отмывают дистиллированной водой до pH около 8. Отмытую целлюлозу суспендируют в 15 объемах 0,5 н. HCl, 30 мин перемешивают при комнатной температуре и отмывают дистиллированной водой до нейтральной реакции.

С помощью такой обработки КМ-целлюлозу удастся перевести в H^+ -форму; точно так же ее регенерируют после использования. Прежде чем начать хроматографию, необходимо уравновесить КМ-целлюлозу соответствующим «стартовым» буферным раствором.

3. *Подбор условий хроматографии.* Для разделения любой смеси крупных пептидов требуются индивидуальные условия фракционирования, поэтому нельзя дать рекомендаций, которые были бы применимы во всех случаях. Обычно имеются три возможности изменения условий: а) снижение pH элюента, б) изменение молярности элюента и в) одновременное изменение и pH, и молярности элюента.

При работе с КМ-целлюлозой в NH_4^+ -форме удобно реализовать возможность (в), поскольку связывание со смолой в NH_4^+ -форме довольно слабое, и это позволяет вести элюирование в мягких условиях, не повреждая полипептидные цепи. При хроматографии на КМ-целлюлозе обычно используются буферные растворы с pH 4—6,5 и молярностью 0,01—0,5 М. Если, например, в качестве стандартного раствора выбран 0,01 М аммонийацетатный буферный раствор pH 4, им же следует уравновесить КМ-целлюлозу. Однако иногда при переводе ионообменника из H^+ -формы в NH_4^+ -форму возникают затруднения. Чтобы ускорить этот процесс, рекомендуется предварительно отмытую КМ-целлюлозу в течение по меньшей мере 10 мин перемешивать с 10 объемами стартового буферного раствора. Суспензию оставляют для отстаивания и надосадочную жидкость декантируют. Размешивание в стартовом буферном растворе повторяют до тех пор, пока pH и электропроводность надосадочной жидкости не станут стабильными. После этого заполняют колонку КМ-целлюлозой в стартовом буферном растворе и уплотняют смолу до ее конечного объема.

В аналитическом варианте на колонку размером 1×30 см наносят 1—10 мг фракционируемого материала. Для препаративного разделения 50—100 мг материала необходима колонка размером $2 \times \times 60$ см.

4. *Регистрация хроматографического разделения.* Если фракционируемый материал содержит относительно много тирозиновых и фенилаланиновых остатков, то довольно полную информацию о ходе хроматографии можно получить, определяя экстинкцию элюата при 280 нм (E_{280}) и строя соответствующий график.

Поглощение при 220 нм характеризует пептидные связи, однако если хроматография проводится в буферном растворе, содержащем соли аммония, то ориентироваться на этот показатель нельзя.

Если концентрацию фракционируемых веществ не удастся определить спектрофотометрически, то полученные фракции можно подвергнуть щелочному гидролизу и проанализировать с помощью нингидриновой реакции (см. стр. 199).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Почти однородная волокнистая или гранулярная КМ-целлюлоза обеспечивает сравнительно постоянную скорость протекания элюента через колонку. Однако если в суспензии ионообменника содержится много мелких частиц, то колонка постепенно забивается. Поэтому рекомендуется во время подготовки и регенерации ионообменника удалять мелкие, плохо оседающие частички смолы.

2. Для хроматографии удобно пользоваться аммонийформатным или каким-либо другим летучим буферным раствором, поскольку полученные при этом фракции после лиофилизации можно использовать без предварительного обессоливания.

Е. ХРОМАТОГРАФИЯ ПЕПТИДОВ НА КОЛОНКЕ С ДЭАЭ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

Принцип метода. Группы $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ДЭАЭ-целлюлозы обладают слабыми анионообменными свойствами в хлоридной, ацетатной и других формах.

Область применения. Аналитическое и микропрепаративное фракционирование крупных полипептидов.

МЕТОДИКА

1. *Выбор типа целлюлозы.* Все замечания, сделанные относительно типов КМ-целлюлозы, справедливы и для ДЭАЭ-целлюлозы (стр. 200). В дополнение к обычно рекомендуем микрогранулярным препаратам ионообменников (например, DE 52 фирмы Whatman) мы советуем обратить внимание на сферическую ДЭАЭ-целлюлозу, изготавливаемую фирмой Reanal (Венгрия).

2. *Обработка ДЭАЭ-целлюлозы.* Независимо от микроструктуры ионообменник обрабатывают следующим образом: сначала его перемешивают с 15-кратным количеством (сухой вес/объем) 0,5 н. HCl 30 мин при комнатной температуре и на воронке или декантацией отмывают дистиллированной водой до pH 4. После этого ДЭАЭ-целлюлозу 30 мин при комнатной температуре перемешивают с 15-кратным количеством 0,5 н. NaOH и отмывают дистиллированной водой, до тех пор пока суспензия не будет давать нейтральной реакции. Обработанную таким образом целлюлозу уравнивают стартовым буферным раствором.

3. *Подбор условий хроматографии.* Для хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, как и на КМ-целлюлозе, не существует каких-либо общих стандартных условий. Подобно тому, как это делают при хроматографии на КМ-целлюлозе, мы можем подобрать для каждого конкретного материала оптимальные условия разделения: а) изменяя рН, б) увеличивая молярность и в) одновременно увеличивая молярность и изменяя рН буферного раствора.

Обычно хроматографию начинают при рН 7,5—8,0 и при концентрации иона Cl^- или CH_3COO^- 0,01—0,005 М и заканчивают при рН 8,0—8,5 и концентрации элюента 0,5—0,75 М. Определенные преимущества имеет градиентное элюирование.

ДЭАЭ-целлюлозу уравнивают так же, как и КМ-целлюлозу (см. стр. 200).

ПРИМЕЧАНИЯ

Нерастворимые в воде полипептиды можно фракционировать в буферных растворах, содержащих 6—8 М мочевины. Мочевину следует перекристаллизовать и обессолить на ионообменнике, поскольку соли, содержащиеся в препарате мочевины в качестве примесей, могут изменить ионную силу раствора, и хроматография станет плохо воспроизводимой. Особенно важно провести предварительную очистку мочевины, если молярность стартового буферного раствора низка (0,001—0,005 М).

Крупные полипептиды часто склонны агрегировать или вступать в ассоциации с другими компонентами. Во избежание этого, кроме мочевины, в буферный раствор можно добавлять додецилсульфат натрия в концентрации 0,1 %. Однако не следует забывать, что этот детергент связывается с белками и делает полипептидные цепи устойчивыми к действию протеаз. Для удаления связавшегося додецилсульфата натрия лиофилизированные фракции отмывают ацетоном, подкисленным HCl . После такой обработки полипептиды вновь становятся чувствительными к действию протеаз.

Мелкие частицы из препаратов ДЭАЭ-целлюлозы удаляют при отстаивании суспензии и декантации надосадочной жидкости, так же как при обработке КМ-целлюлозы.

Рекомендуемая литература

Kasper C. B. in Needleman S. P. ed., Protein Sequence Determination, p. 165—180, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1970.

ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ

А. ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ НА КОЛОНКЕ С ДЭАЭ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

1. ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКЕ С ДЭАЭ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ В ОН⁻-ФОРМЕ

ДЭАЭ-целлюлоза благодаря своей функциональной группе — диэтиламиноэтильному остатку — обладает свойствами слабого анионообменника. Ее используют главным образом для разделения природных высокомолекулярных полимеров, особенно чувствительных к резким изменениям pH и температуры, т. е. в первую очередь для фракционирования белков. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе отличается высокой разрешающей способностью. Этот ионообменник пригоден как для аналитического, так и для препаративного фракционирования белков на колонках соответствующего размера.

а) *Подготовка ДЭАЭ-целлюлозы.* Перед заполнением колонки ДЭАЭ-целлюлозу обрабатывают следующим образом:

1) Необходимое количество ДЭАЭ-целлюлозы в течение 15 мин при комнатной температуре перемешивают в 5-кратном количестве 0,5 н. NaOH и оставляют для отстаивания. Неосевшие мелкие частицы ионообменника декантируют вместе с надосадочной жидкостью.

2) Несколько раз ДЭАЭ-целлюлозу отмывают дистиллированной водой до pH 8—9. Отмывание удобно проводить с помощью центрифугирования, при котором частички целлюлозы оседают гораздо быстрее и вся процедура отмывания требует меньше времени.

3) Отмытую ДЭАЭ-целлюлозу смешивают с 3-кратным количеством 96%-ного этанола, оставляют отстаиваться и затем надосадочную жидкость декантируют.

4) Обработку 0,5 н. NaOH проводят еще раз.

5) Целлюлозу отмывают дистиллированной водой до нейтральной реакции с помощью центрифугирования.

Обработанную таким образом ДЭАЭ-целлюлозу можно хранить в виде водной суспензии при 4°C. Следует избегать хранения ионообменников при комнатной температуре из-за опасности микробного заражения.

б) *Выбор размера колонки.* Белки со средним молекулярным весом (около 50 000) обычно разделяют на длинных узких колонках. Для фракционирования 100 мг белка на ДЭАЭ-целлюлозе емкостью 0,7—0,8 экв/г нужна колонка размером 1,5 × 35 см. В зависимости

от свойств фракционируемого белка, содержания в нем примесей, способа элюирования и т. д. размеры колонки могут варьировать как по диаметру, так и по длине.

Проведя соответствующие предварительные опыты, можно рассчитать оптимальные размеры колонки для препаративного разделения больших количеств белка. Чтобы обеспечить оптимальную скорость протекания жидкости через колонку и тем самым достаточно быструю хроматографию, увеличивать объем колонки следует в первую очередь за счет увеличения ее диаметра. Для фракционирования 1,0 г белка со средним молекулярным весом достаточно иметь колонку $3,5 \times 45$ см.

в) *Скорость протекания жидкости через колонку.* Задаваемая скорость протекания жидкости через колонку определяется размерами данной колонки. При микропрепаративной хроматографии на колонке $1,5 \times 35$ см оптимальной является скорость 15—20 мл/ч. Препаративная хроматография на колонке большего диаметра проводится со скоростью протекания жидкости 25—30 мл/ч; при более высоких скоростях разделение ухудшается и фракции больше разбавляются.

г) *Подбор условий хроматографии.* Колоночную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе можно вести путем ступенчатого и градиентного элюирования. Ступенчатое элюирование целесообразно только в том случае, если фракционируемые компоненты элюируются при сильно различающихся значениях рН и молярности, т. е. когда нет опасности смешения отдельных фракций.

При любом способе элюирования оптимальные для данного материала условия хроматографии подбираются, исходя из трех уже известных альтернатив: 1) увеличение молярности элюента 2) увеличение рН элюента при постоянной молярности и 3) одновременное увеличение рН и молярности элюента.

Хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе обычно начинают в буферном растворе рН 8 невысокой молярности. Фракционируемый материал растворяют в 0,05 М буферном растворе рН 7,8—8,2 и после нанесения его на колонку ступенчато или с помощью градиента увеличивают молярность элюента сначала до 0,1, потом до 0,5 и наконец до 1,0 М.

Выбор буферного раствора определяется исключительно природой фракционируемого материала. Если хлориды не вступают с последним в реакцию, то рекомендуется проводить хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе в Cl^- -форме.

2. ДЭАЭ-ЦЕЛЛЮЛОЗА В Cl^- -ФОРМЕ

а) *Перевод ДЭАЭ-целлюлозы в Cl^- -форму.* ДЭАЭ-целлюлозу в OH^- -форме, обработанную, как описано выше, и суспендированную в дистиллированной воде, перемешивают в течение 15 мин при ком-

натной температуре с 3 объемами 0,05 М трис-HCl pH 8. Суспензию оставляют отстаиваться и после декантации надосадочной жидкости дважды повторяют такое перемешивание. Затем ДЭАЭ-целлюлозу суспендируют в том же буферном растворе и заполняют ею колонку соответствующих размеров так, чтобы столбик ионообменника был гомогенным и не содержал пузырьков воздуха. После заполнения колонки ДЭАЭ-целлюлозу промывают вышеупомянутым буферным раствором до тех пор, пока электропроводность и pH элюата не достигнут показателей промывающего раствора. На этой стадии колонка готова к фракционированию.

б) *Хроматография нативных белков на ДЭАЭ-целлюлозе в Cl^- -форме.* Фракционируемый материал растворяют в небольшом объеме стартового буферного раствора (обычно 100 мг в 3—5 мл). Растворителем служит буферный раствор 0,05 М трис-HCl pH 8 (указанная молярность относится к ионам Cl^-), в котором материал связывается с ионообменником. Раствор фракционируемого материала предварительно в течение 10 ч диализуют против этого же буферного раствора.

Осторожно удаляют из верхней части колонки буферный раствор над целлюлозой так, чтобы над ионообменником остался слой жидкости высотой не более 2—3 мм. Раствор фракционируемого материала осторожно насаивают на ДЭАЭ-целлюлозу круговыми движениями руки, прикасаясь загнутым кончиком пипетки к внутренней поверхности колонки. При насаивании важно не взбалтывать частички ДЭАЭ-целлюлозы. Нанесенный раствор входит в ионообменник, и затем остатки наносимого материала трижды смывают со стенок верхней части колонки 0,5—1,0 мл 0,05 М буферного раствора.

При 0,05 М концентрации ионов Cl^- нативные белки хорошо связываются с ДЭАЭ-целлюлозой. Несвязавшиеся компоненты фракционируемой смеси удаляют, промывая колонку одним объемом буферного раствора.

в) *Градиентное элюирование.* Если фракционирование проводят на колонке размером $1,5 \times 35$ см, то для элюирования достаточны сосуды объемом по 100 мл, один из которых является смесителем, а другой — резервуаром для буферного раствора. В смеситель заливают 0,1 М, в резервуар — 0,5 М буферный раствор, соединяют их тефлоновой или поливинилхлоридной трубкой, свободной от пузырьков воздуха, и подключают к колонке смеситель, стоящий на магнитной мешалке.

С помощью винтового зажима на тефлоновой или поливинилхлоридной трубке на выходе колонки устанавливают оптимальную скорость протекания жидкости, равную примерно 1 мл/мин.

Элюат собирают фракциями по 0,5—1,0 мл. Если есть соответствующий прибор, то производится непрерывная спектрофотометрия и регистрация оптической плотности элюата, а полученные

фракции объединяют согласно вычерченному самописцем графику. При отсутствии автоматического проточного абсорбциометра все фракции элюата спектрофотометрируют при 280 нм, строят график изменения оптической плотности и по нему отбирают нужные фракции.

Определив экстинкцию исходного материала и полученных фракций, можно установить выход препарата в результате хроматографического разделения.

3. ХРОМАТОГРАФИЯ НА ДЭАЭ-ЦЕЛЛЮЛОЗЕ В ПРИСУТСТВИИ МОЧЕВИНЫ

Помимо хроматографии нативных белков, для решения ряда задач необходимо проводить хроматографическое разделение модифицированных (восстановленных, окисленных, карбоксиметилированных, алкилированных и т. д.) белковых производных. Прежде всего это необходимо при определении аминокислотной последовательности тех белков, которые состоят из нескольких полипептидных цепей различной структуры. В этих случаях, прежде чем приступить к анализу последовательности аминокислот в полипептидных цепях, необходимо разделить последние.

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе в присутствии высокой концентрации мочевины является одним из лучших методов фракционирования денатурированных или химически модифицированных белков.

Подготовка ДЭАЭ-целлюлозы для хроматографии в Cl^- -форме производится так же, как указано выше, но уравнивание колонок, растворение фракционируемого материала и элюирование осуществляют буферными растворами, содержащими 8 М мочевину. В качестве стартового буферного раствора в данном случае используют буферный раствор трис- HCl рН 8, содержащий 0,05 М Cl^- и 8 М мочевины. Чтобы предотвратить агрегацию и ассоциацию молекул фракционируемого материала в присутствии мочевины, к буферному раствору добавляют 0,1% додецилсульфата натрия. В полученном растворе, содержащем оба детергента (мочевину и додецилсульфат натрия), растворяют фракционируемый материал, который диализуют против того же раствора в течение 24 ч.

Условия связывания фракционируемого материала и подбор градиента для элюирования не отличаются от описанных выше, однако все буферные растворы должны содержать 8 М мочевину.

Удаление мочевины. Почти всю мочевину, содержащуюся в полученных фракциях, удастся удалить диализом. После 72 ч диализа в растворе остается не более 1—5% ее первоначального содержания. Если данная фракция растворима в воде, ее освобождают от мочеви-

ны гель-фильтрацией. Не растворимый в воде белок можно освободить от мочевины, промывая выпавший при диализе осадок несколько раз дистиллированной водой с помощью центрифугирования.

После этой операции водную суспензию нерастворимого белка лиофилизируют.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Порошкообразную или волокнистую ДЭАЭ-целлюлозу нельзя регенерировать в колонке. По окончании хроматографии ионообменник извлекают из колонки и хранят на холоду. Когда накапливается достаточное количество использованной ДЭАЭ-целлюлозы, ее регенерируют, как описано выше.

2. В связи с опасностью бактериального прорастания не следует оставлять колонку регенерированного, готового к фракционированию ионообменника при комнатной температуре.

3. Подготовка колонки, заполненной сферической ДЭАЭ-целлюлозой (полимер в виде шариков), не отличается от подготовки колонки с гранулярной или волокнистой целлюлозой. Использование сферической ДЭАЭ-целлюлозы имеет ряд весьма существенных преимуществ, несмотря на несколько меньшую разрешающую способность:

1) Скорость протекания жидкости через колонку со сферической ДЭАЭ-целлюлозой постоянна, и во время хроматографии не происходит усадки ионообменника.

2) Заполнение колонки сферической ДЭАЭ-целлюлозой весьма просто; гомогенный столбик ионообменника получить довольно легко.

3) В отличие от других типов ионообменника, которые весьма прочно связывают денатурированные белки, сферическая ДЭАЭ-целлюлоза обладает меньшей абсорбционной способностью и благодаря этому ее можно регенерировать в колонке.

4) Простота заполнения колонки, постоянная скорость протекания жидкости через ионообменник и несложный процесс регенерации делают сферическую ДЭАЭ-целлюлозу пригодной для использования в больших препаративных колонках.

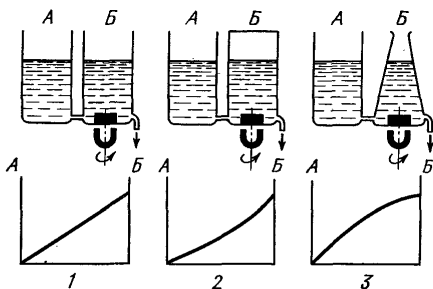
Рекомендуемая литература

- Block H. J., Bolling D.*, The Amino Acids Composition of Proteins and Foods. Analytical Methods and Results, Springfield, Thomas Publ., 1951.
Smith I., Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vols 1 and 2, London, Heinemann Publ., 1960.

4. ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ НА КОЛОНКЕ С ДЭАЭ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

а) *Подготовка ДЭАЭ-целлюлозы.* Необходимое количество ДЭАЭ-целлюлозы сначала с помощью декантации трижды отмывают дистиллированной водой, а затем последовательно следующими растворами: 0,5 М NaOH, дистиллированной водой, 0,3 М NaH_2PO_4 , дистиллированной водой, 0,5 М NaOH, дистиллированной водой и 0,005 М Na_2HPO_4 .

Отмывание ионообменника дистиллированной водой всегда проводят до тех пор, пока pH декантируемой воды не станет равным



Фиг. 41. Градиентное элюирование при ионообменной хроматографии. Буферный раствор, заполняющий резервуар А, имеет большую ионную силу, чем раствор, находящийся в смесителе В. Градиенты концентрации: 1 — линейный; 2 — «вогнутый»; 3 — «выпуклый».

pH добавляемой. В последнем цикле отмывания ДЭАЭ-целлюлозу уравнивают стартовым буферным раствором.

б) *Заполнение колонки.* Заполнение колонки и уплотнение ионообменника производят с помощью сжатого воздуха. Ионообменник суспендируют в стартовом буферном растворе, перемешивают до получения гомогенной суспензии и, заполняя колонку размером 1×60 см, оставляют для оседания. Затем целлюлозу уплотняют сжатым воздухом под давлением 0,5 атм. После этого проверяют полноту уравнивания, т. е. определяют, равен ли pH элюата pH стартового буферного раствора. Если равенства нет, через колонку ионообменника пропускают дополнительно стартовый буферный раствор до тех пор, пока колонка не уравнивается.

в) *Подготовка градиентного элюирования.* Схематическое изображение используемых сосудов, а также типы градиентов представ-

лены на фиг. 41. Объем смесителя, которым может быть любой круглый сосуд, равен 500 мл, объем резервуара для буферного раствора—1000 мл. Резервуар ставят на 7,5 см выше смесителя. Смеситель заполняют 0,01 М фосфатным буферным раствором pH 8,4, в резервуар заливают 0,3 М буферный раствор pH 4,2. Стартовый 0,005 М фосфатный буферный раствор pH 8,4 подают на колонку из отдельного сосуда.

г) *Нанесение сыворотки.* 2 мл свежей или размороженной перед опытом сыворотки в течение суток диализуют против стартового буферного раствора. Буферный раствор над ионообменником в колонке осторожно удаляют и пипеткой наносят диализованную сыворотку. После ее нанесения остатки препарата трижды смывают отдельными порциями буферного раствора по 2 мл.

д) *Хроматография.* Сначала хроматографию ведут в стартовом буферном растворе со скоростью протекания 50 мл/ч до тех пор, пока не выйдет первый пик. Затем, не меняя этой скорости, начинают градиентное элюирование. Собирают фракции элюата по 3—5 мл (всего около 500 мл) и определяют содержание белка в полученных фракциях либо непрерывной спектрофотометрией, например с помощью «Увикорда» фирмы LKB, либо спектрофотометрией каждой фракции при 280 нм.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Хроматографию сыворотки можно проводить при комнатной температуре, однако все же лучше колонку охлаждать.

2. По нашим данным, емкость различных препаратов ДЭАЭ-целлюлозы может вообще существенно различаться, а также изменяться после регенерации. Поэтому в каждом случае приходится применять колонки разных размеров и наносить разное количество белка. В связи с этим рекомендуется в предварительном опыте с данным препаратом ионообменника определить наиболее подходящие условия хроматографии.

3. Регенерируют ДЭАЭ-целлюлозу так же, как и при подготовке ее к фракционированию сыворотки (см. стр. 209).

4. Проще всего идентифицировать белковые компоненты сыворотки, содержащиеся в разных фракциях элюата, с помощью иммуноэлектрофореза. В вышедшем со стартовым буферным раствором первом пике обычно содержится значительная часть сывороточного IgG; за ним выходят остальные фракции γ -глобулина, β - и α -глобулины, и последним элюируется альбумин.

5. Если градиентное элюирование проводить так, как это описал Фехий, то в смеситель заливают 0,1 М фосфатный буферный раствор pH 8,0, а в резервуар — 0,3 М фосфатный буферный раствор pH 8,0.

6. Непрерывную подачу буферного раствора с постоянной скоростью лучше всего можно осуществить с помощью подходящих насосов. Хорошо себя зарекомендовали используемые для этой цели

насосы фирмы LKB: «Минифлоу», «Перистальтический» и «Перпекс».

7. *Концентрирование белковых фракций с помощью диализа под давлением.* Для этой цели используют трубки из диализной мембраны диаметром 8 мм (трубка «Вискинг» фирмы Scientific Instrument Centre Ltd). Трубку соответствующей длины смачивают дистиллированной водой, и один конец завязывают двойным узлом. Чтобы проверить герметичность нижнего узла, трубку погружают в воду и надувают воздухом. Верхний конец диализной трубки пропускают через отверстие в резиновой пробке и надевают на конец воронки соответствующих размеров, затем воронку с надетой диализной трубкой вставляют в отверстие резиновой пробки. Концентрируемый раствор белка через воронку заливают в диализную трубку, легким нажатием изгоняют пузырьки воздуха и помещают заполненную трубку в вакуумную колбу Бунзена подходящих размеров так, чтобы пробка, через которую проходит конец воронки, плотно входила в горло колбы. Герметичность контакта резины со стеклом можно проверить, нанеся несколько капель воды по краю пробки.

Вакуумную колбу соединяют с водоструйным насосом и создают разрежение. Под вакуумом происходит фильтрация растворителя через диализную мембрану внутрь колбы и начинается концентрирование раствора белка. На выходной шланг вакуумной колбы накладывают зажим, чтобы сохранить разрежение, и всю систему помещают в холодильник или в холодную комнату. Если объем концентрируемого раствора больше объема воронки, то по мере концентрирования раствор белка подливают. Когда объем раствора уменьшится до нужной степени, вакуумную колбу с диализной трубкой извлекают из холодильника, открывают зажим и вынимают трубку из колбы. Затем надрезают мембрану и переливают сконцентрированный белковый раствор в соответствующий сосуд, смыв туда же небольшим количеством буферного раствора остатки со стенок диализной трубки.

8. *Концентрирование растворов с помощью лифогеля.* Лифогель, изготавливаемый фирмой Gelman Instrument Company (США), представляет собой полиакриламидный гель, с помощью которого можно концентрировать растворы высокомолекулярных веществ. Каждый грамм лифогеля способен связать до 5 г воды, причем равновесие устанавливается в течение 5 ч. Концентрируемый раствор помещают в сосуд соответствующего размера и прибавляют столько лифогеля, сколько требуется для того, чтобы была достигнута необходимая концентрация (при этом нужно иметь в виду, что 1 г лифогеля, набухая в водной среде, занимает объем 25 мл). Когда концентрирование закончится, набухший лифогель легко удаляют фильтрованием. После высушивания при 65°C его можно использовать вновь¹.

¹ Одним из наиболее быстрых и удобных методов концентрирования белковых растворов является мембранная фильтрация (см. стр. 27). — *Прим. ред.*

Б. ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ НА КОЛОНКЕ С КАТИОНООБМЕННОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

1. КМ-ЦЕЛЛЮЛОЗА

А. Подготовка КМ-целлюлозы для хроматографии. Перед хроматографией КМ-целлюлозу следует обработать следующим образом:

1) Нужное количество целлюлозы в течение 15 мин перемешивают при комнатной температуре с 5-кратным количеством 0,5 М NaOH. После оседания частиц ионообменника надосадочную жидкость декантируют.

2) Обработанную щелочью КМ-целлюлозу отмывают дистиллированной водой до нейтральной реакции. Гранулярную или волокнистую целлюлозу рекомендуется отмывать с помощью centrifугирования или фильтрованием на воронке Бюхнера. Сферическая КМ-целлюлоза при отстаивании суспензии оседает очень быстро, поэтому ее можно отмывать декантацией в химическом стакане.

3) Чтобы перевести отмывую до нейтральной реакции КМ-целлюлозу в H^+ -форму, ее суспендируют в 0,5 н. HCl и перемешивают в течение 15 мин при комнатной температуре. Суспензию оставляют отстаиваться, декантируют надосадочную жидкость и вновь повторяют обработку кислотой. После этого КМ-целлюлозу отмывают дистиллированной водой до нейтральной реакции, как описано в предыдущем разделе.

4) КМ-целлюлоза в H^+ -форме может храниться в виде водной суспензии при 4°C.

Б. Выбор размеров колонки. Для фракционирования 100 мг белка или полипептида при использовании КМ-целлюлозы, имеющей емкость 0,7—0,8 экв/г, требуется колонка 1,5 × 35 см. Препаративное разделение 1,0 г белка можно проводить на колонке 3,5 × 45 см.

В. Скорость протекания жидкости через колонку. Скорость протекания определяется свойствами КМ-целлюлозы. В колонке волокнистой или гранулярной целлюлозы размером 1,5 × 35 см она достигает 60 мл/ч. Чтобы получить хорошее разделение при хроматографии на сферической КМ-целлюлозе, следует несколько уменьшить скорость протекания.

Г. Подбор условий хроматографии. Можно применять как ступенчатое, так и градиентное элюирование. Ступенчатое элюирование удобно только в тех случаях, когда компоненты фракционируемой смеси элюируются при существенно различающихся значениях рН и молярности элюента.

Градиентное элюирование можно осуществлять тремя способами:

1) увеличивать молярность элюента при постоянном рН, 2) менять рН элюента при постоянной молярности, 3) вести элюирование в градиенте как рН, так и молярности элюента.

Выбор оптимальных условий фракционирования в каждом данном случае делается на основании предварительных опытов хроматографии. Однако, как правило, для фракционирования природных полимеров с катионными свойствами, таких, как полипептиды и белки, удобнее градиентное элюирование с увеличением молярности элюента при постоянном рН.

Хроматографию на КМ-целлюлозе можно начинать как в H^+ -, так и в NH_4^+ -форме катионообменника. Перевод КМ-целлюлозы в H^+ -форму описан выше. Перевод катионообменника из H^+ -формы в NH_4^+ -форму производят следующим образом.

КМ-целлюлозу в H^+ -форме суспендируют в 5-кратном количестве 0,1 М раствора ацетата аммония рН 4,6 и в течение 30 мин в химическом стакане перемешивают суспензию при комнатной температуре. После оседания частичек целлюлозы надосадочную жидкость декантируют и описанную процедуру повторяют еще три раза. Затем суспензией целлюлозы в том же растворе заполняют колонку и после соответствующего уплотнения отмывают ее 0,01 М буферным раствором до тех пор, пока рН и электропроводность элюата не станут равными этим же показателям элюента.

Д. Хроматография на колонке с КМ-целлюлозой в H^+ -форме с помощью градиентного элюирования. Колонку 1,5 × 35 см заполняют КМ-целлюлозой в H^+ -форме и промывают дистиллированной водой.

100 мг фракционируемого материала растворяют в 3—5 мл 0,01 М аммонийацетатного буферного раствора рН 4,6. Удалив слой дистиллированной воды над КМ-целлюлозой в колонке, пипеткой, имеющей загнутый конец, круговыми движениями руки наносят исследуемый раствор на ионообменник. После того как нанесенный раствор войдет в КМ-целлюлозу, его остатки аккуратно смывают тремя порциями буферного раствора по 1 мл.

Через колонку пропускают 1,5 объема (относительно объема ионообменника) 0,01 М аммонийацетатного буферного раствора и начинают градиентное элюирование при постоянном рН 6,7, увеличивая молярность от 0,01 до 0,5 М, а затем при необходимости от 0,5 до 1,0 М.

Для создания градиента в соединенный с колонкой смеситель и в резервуар наливают по 100 мл аммонийацетатного буферного раствора рН 6,7 с молярностями 0,01 и 0,5 М соответственно. Устанавливают скорость протекания 1 мл/мин и после того, как через колонку пройдет 200 мл элюента, если это необходимо, начинают элюирование вторым градиентом молярности, повышая ее от 0,5 до 1,0 М.

Полученные фракции элюата объединяют в соответствии с оптической плотностью при 280 нм (или кривой непрерывной регистрации оптической плотности).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Основное преимущество используемого аммонийацетатного буферного раствора заключается в его летучести, благодаря которой обессоленные фракции можно получать без диализа лиофилизацией. Кроме того, этот буферный раствор можно использовать в широком интервале pH. Вместе с тем для хроматографии на КМ-целлюлозе можно применять и другие буферные растворы.

2. Для хроматографии используется волокнистая, гранулярная и сферическая КМ-целлюлоза. Волокнистую и гранулярную КМ-целлюлозу из-за высокой абсорбционной активности нельзя регенерировать непосредственно в колонке. По окончании хроматографии приходится извлекать ионообменник из колонки и по мере накопления достаточных количеств подвергать регенерации. Производные целлюлозы подвержены бактериальному заражению, поэтому собираемую для регенерации КМ-целлюлозу следует хранить при 4° С.

3. Абсорбционная способность сферической КМ-целлюлозы весьма невелика, поэтому после 2—4 опытов по фракционированию ее можно регенерировать в колонке.

4. Для препаративного фракционирования рекомендуется использовать сферические ионообменники. Ими легче заполнять колонку, они быстро оседают при отмывании декантацией и обеспечивают постоянную скорость протекания раствора через колонку в отличие от волокнистых и гранулярных носителей, которые вызывают снижение скорости протекания в процессе хроматографии.

2. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА КОЛОНКЕ С ФОСФОЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

А. Подготовка колонки. Соответствующее количество фосфоцеллюлозы (Ф-целлюлозы) сначала с помощью декантации трижды отмывают дистиллированной водой, а затем последовательно: 0,5 М NaOH, дистиллированной водой, 0,1 М H_3PO_4 , дистиллированной водой и стартовым буферным раствором. Отмывание дистиллированной водой всегда продолжают до тех пор, пока pH надсадочной жидкости не достигнет pH воды. Окончательное уравнивание ионообменника стартовым буферным раствором производят уже в колонке.

Б. Хроматография. На колонку размером 1×50 см пипеткой осторожно наносят 2 мл сыворотки, диализованной в течение суток против стартового буферного раствора. После того как нанесенная сыворотка войдет в Ф-целлюлозу, ее остатки смывают тремя порциями буферного раствора по 2 мл. Фракционирование белков производят с помощью ступенчатого элюирования, подавая на колонку следующие растворы: 0,02 М NaH_2PO_4 (стартовый буферный

раствор), 0,04 М фосфатный буферный раствор рН 5,8, 0,05 М фосфатный буферный раствор рН 6,2, 0,06 М фосфатный буферный раствор рН 6,6, 0,1 М фосфатный буферный раствор рН 7,2, 0,1 М фосфатный буферный раствор + 0,5 М NaCl рН 9,5.

Элюирование ведут со скоростью 50 мл/ч, элюат собирают фракциями по 5—6 мл. Регистрация оптической плотности раствора осуществляется с помощью автоматического прибора с самописцем, например «Увикорда» фирма ЛКВ. Каждый новый элюирующий раствор подают только после того, как полностью выйдет пик, вымываемый предыдущим.

3. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА КОЛОНКЕ С КМ-ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

А. Подготовка колонки. Колонку КМ-целлюлозы готовят так же, как колонку Ф-целлюлозы, но отмывка ионообменника несколько отличается; ее проводят следующим образом: 0,5 М NaOH, дистиллированной водой, 0,1 М уксусной кислотой, дистиллированной водой и стартовым буферным раствором.

Б. Хроматография. Фракционирование происходит так же, как и на колонке Ф-целлюлозы. Для последовательных ступеней элюирования рекомендуется применять следующие буферные растворы: 0,02 М ацетатный буферный раствор рН 4,6 (стартовый), 0,05 М ацетатный буферный раствор рН 5,2, 0,08 М ацетатный буферный раствор рН 6,0, 0,1 М фосфатный буферный раствор рН 7,0 и 0,1 М фосфатный буферный раствор + 0,5 М NaCl рН 9,2.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Оптимальные размер колонки и количество наносимого белка для данного препарата катионообменника в каждом случае необходимо определить в предварительных экспериментах.

2. Катионообменные целлюлозы при регенерации обрабатывают так же, как при подготовке колонки к хроматографии.

В. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ НА КОЛОНКЕ С ДЭАЭ-СЕФАДЕКСОМ

Принцип метода. Белки, связанные на колонке с ДЭАЭ-сефадексом при данном значении рН, элюируют, снижая рН и увеличивая ионную силу элюента.

Область применения. Фракционирование на ДЭАЭ-сефадексе с успехом можно использовать во всех областях биохимии, белковой химии, иммунологии и клинической химии для выделения белковых фракций.

МЕТОДИКА

1. *Подготовка колонки.* Для анионообменной хроматографии белков обычно применяют ДЭАЭ-сефадекс А-50. 1,0 г ионообменника суспендируют в дистиллированной воде и оставляют на 1 ч, после чего надосадочную жидкость вместе с медленно оседающими мелкими частичками декантируют. Затем ионообменник отмывают от нонов Cl^- 0,5 М NaOH. Избыток щелочи отмывают дистиллированной водой и продолжают дальнейшее отмывание кислотой. В связи с тем, что белки сыворотки крови обычно фракционируют в фосфатном буферном растворе, в качестве кислого отмывающего раствора применяют 0,1 М фосфорную кислоту. Избыток кислоты в свою очередь отмывают дистиллированной водой, а затем ионообменник отмывают стартовым буферным раствором до тех пор, пока не наступит равновесие. Проще всего отмывание вести фильтрованием на воронке Бюхнера, поскольку при этом удобно не только отмывать, но и анализировать промывную жидкость.

Подготовить ДЭАЭ-сефадекс к хроматографии можно и другим способом: ионообменник на сутки оставляют набухать в большом избытке стартового буферного раствора, несколько раз меняя его. Если через сутки не наступит равновесие, то смену надосадочной жидкости продолжают до тех пор, пока ее pH не будет равен pH стартового буферного раствора.

2. *Заполнение колонки ионообменником.* К набухшему и уравновешенному стартовым буферным раствором ДЭАЭ-сефадексу добавляют немного буферного раствора и, закрыв выходное отверстие, полученной негустой, тщательно перемешанной суспензией заполняют колонку, в которую предварительно на одну треть высоты наливают стартовый буферный раствор. Затем выходное отверстие открывают и продолжают постепенно заполнять колонку ионообменником до нужной высоты. После этого проверяют, уравновешена ли колонка; если равновесия нет, ее продолжают промывать стартовым буферным раствором до тех пор, пока pH вытекающей жидкости не будет равен pH стартового буферного раствора.

3. *Подготовка системы для градиентного элюирования.* В качестве смесителя используют колбу на 0,5 л со стартовым буферным раствором (0,02 М фосфатный буфер pH 8,0). Резервуар, образующий замкнутую систему со смесителем, представляет собой сосуд объемом 1 л, заполненный 0,3 М буферным раствором. Непрерывную подачу буферного раствора на колонку осуществляют с помощью насоса. Открыв выходное отверстие, понижают уровень буферного раствора в колонке до уровня геля. Затем на ионообменник аккуратно, стараясь не взмутить верхний слой геля, наносят фракционируемую сыворотку, которую предварительно в течение суток диализуют против стартового буферного раствора. Нанесенный образец смывают тремя порциями стартового буферного раствора по 2 мл и приступают к хроматографии. Для фракционирования 3 мл сы-

воротки требуется колонка ДЭАЭ-сефадекса размером 2×50 см.

4. *Хроматография.* Хроматографию проводят так же, как описано для колонки с ДЭАЭ-целлюлозой (см. стр. 209).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Закончив хроматографию, гель сефадекса сразу же извлекают из колонки и регенерируют. Прежде всего нужно удалить белки, которые, по всей вероятности, остаются адсорбированными на ионообменнике. Это достигается отмыванием геля в $1\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ с последующим отмыванием дистиллированной водой до нейтральной реакции (до pH дистиллированной воды). После этого гель ионообменника уравнивают стартовым буферным раствором.

2. Емкость ДЭАЭ-сефадекса обычно составляет 3 экв/г. В соответствии с этим на колонку ДЭАЭ-сефадекса, приготовленную из 1,0 г сухого ионообменника, можно нанести 3 мл сыворотки.

3. При уменьшении ионной силы буферного раствора ионообменные сефадексы очень сильно набухают, поэтому не рекомендуется применять растворы, ионная сила которых ниже 0,05—0,1. Если хроматографию начинают в слишком разбавленном буферном растворе, то при последующем значительном увеличении ионной силы элюирующего буферного раствора происходит уменьшение объема гранул сефадекса, которое может вызвать образование полостей в колонке геля. Образование полостей нарушает равномерное протекание жидкости через колонку и неблагоприятно отражается на результатах хроматографии.

4. Рекомендуется проводить регенерацию геля ДЭАЭ-сефадекса после извлечения его из колонки и перед каждым опытом заполнять колонку вновь; благодаря этим операциям гель становится однородным.

5. Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе очень удобна для выделения из сыворотки IgG и для разделения белков этой фракции, обладающих разной электрофоретической подвижностью. Стартовый буферный раствор сначала вымывает из колонки IgG, имеющие низкую электрофоретическую подвижность. Быстро мигрирующие белки этого же класса выходят только при градиентном элюировании. Хроматография на ДЭАЭ-сефадексе является также общепринятой методикой очистки миеломных IgG.

6. Для катионообменной хроматографии можно использовать КМ-сефадекс G-50. Его предварительную обработку следует проводить так же, как и ДЭАЭ-сефадекса, с той лишь разницей, что КМ-сефадекс сначала обрабатывают 0,5 н. HCl, а затем отмывают щелочью. Процедура хроматографии на КМ-сефадексе G-50 та же, что и на КМ-целлюлозе.

7. По размеру пор ионообменные сефадексы подразделяются на два вида и имеют индексы 25 и 50. Ионообменник с индексом 25

имеет поры меньшего размера, чем сефадекс с индексом 50. Как и при гель-фильтрации, размер пор определяет величину молекул, которые могут диффундировать в гранулы сефадекса. Поэтому для разделения веществ с молекулярным весом меньше 10 000 используют сефадексы с индексом 25, а для разделения веществ с более высоким молекулярным весом применяют сефадексы с индексом 50. Очень большие молекулы не могут проникнуть внутрь гранул сефадекса и адсорбируются на их поверхности. Для фракционирования соединений большого молекулярного веса можно использовать ионообменные сефадексы с любым размером пор.

8. Ионообменные сефадексы производятся в виде гранул диаметром 40—120 мкм, шарообразная форма которых обеспечивает высокую скорость протекания жидкости через колонку. Однако не следует забывать, что набухшие гранулы сефадекса легко подвергаются деформации. Поэтому попытка увеличить скорость протекания повышением давления подаваемого на колонку раствора выше определенного предела может, наоборот, привести к ее уменьшению.

9. pH и ионная сила буферного раствора также влияют на процесс набухания гранул сефадекса и, следовательно, на скорость протекания жидкости через колонку. Для этих параметров следует подобрать такие значения, чтобы максимальное набухание сефадекса или его сжатие не нарушало бы процесса хроматографии.

10. Для оптимального фракционирования очень важно правильно рассчитать количество загружаемого в колонку ионообменника. В каждом конкретном случае рекомендуется в предварительных опытах определить оптимальные размеры колонки. Практика показывает, что для получения хороших результатов высота колонки должна относиться к ее диаметру как 10:1.

11. Набухшие ионообменники можно хранить в виде суспензии в нейтральных растворах в течение нескольких месяцев даже при комнатной температуре, если принять меры предосторожности против бактериального заражения. В суспензии КМ- и сульфэтилсефадекса (СЭ-сефадекс) добавляют 0,02% азида натрия, а в суспензию ДЭАЭ-сефадекса — 1% бутанола.

Г. ВЫДЕЛЕНИЕ IgG ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ БЕСКОЛОННОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ НА ДЭАЭ-СЕФАДЕКСЕ

При соответствующих условиях ДЭАЭ-сефадекс связывает все белки сыворотки, за исключением фракции IgG. Поэтому фракционирование белков сыворотки с помощью этого ионообменника очень удобно для выделения иммунохимически чистого IgG, а также полезно при дальнейшей очистке препаратов IgG, полученных другими способами.

Суть бесколоночного метода заключается в следующем. Фракционируемую сыворотку смешивают с уравновешенным соответствующим буферным раствором ДЭАЭ-сефадексом, который связывает почти все сывороточные белки, оставляя в растворе IgG, легко отделяемый при отмывании. Смешивание с ДЭАЭ-сефадексом повторяют дважды (каждый раз со свежей порцией ионообменника) и в результате получают препарат IgG, свободный от примеси других белков сыворотки, о чем судят по иммуноэлектрофоретическому анализу. Благодаря тому что фракция IgG совсем не связывается с ионообменником, белки этого класса удается выделить почти количественно в нативном состоянии, не опасаясь денатурации, что является большим преимуществом данного метода по сравнению с другими методами выделения IgG.

МЕТОДИКА

ДЭАЭ-сефадекс обрабатывают так же, как и для колоночной хроматографии, затем уравновешивают 0,01 М фосфатным буферным раствором pH 6,5. Когда уравновешивание закончится, буферный раствор удаляют, насколько это возможно, так, чтобы ионообменник оставался едва влажным. Удобнее всего это сделать, поместив ДЭАЭ-сефадекс на выставленную фильтровальной бумагой воронку Бюхнера и пропуская через него буферный раствор под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом.

Фракционируемую сыворотку (1—30 мл) наливают в химический стакан, добавляют к ней необходимое количество влажного ионообменника и перемешивают до получения гомогенной суспензии. Смесь оставляют при 4° С на 1 ч и затем переносят на фильтровальную бумагу, выстилающую воронку Бюхнера. Гель промывают холодным 0,01 М фосфатным буферным раствором pH 6,5 до тех пор, пока в элюате не перестанет обнаруживаться белок (в реакции с сульфосалициловой кислотой). Собранный буферный раствор, содержащий белок, смешивают со свежей порцией ДЭАЭ-сефадекса, полученную суспензию вновь оставляют при 4° С на 1 ч и снова, как описано выше, отмывают белок, не связавшийся с ионообменником. Отмывающий буферный раствор, который в данном случае уже содержит только чистый IgG, можно лиофилизировать или сконцентрировать диализом под давлением.

Рекомендуемая литература

- Determann H.*, Gel Chromatography, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968. (Г. Детерман, Гель-хроматография, изд-во «Мир», М., 1970).
Leach S. J., Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Academic Press, New York, London, 1969.
Williams C. A., Chase M. W., Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. II, Academic Press, New York, London, 1968.

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

А. ОБЕССОЛИВАНИЕ БЕЛКОВЫХ РАСТВОРОВ НА КОЛОНКЕ С СЕФАДЕКСОМ

Принцип метода. Содержащиеся в белковых растворах соли как низкомолекулярные вещества при гель-фильтрации проникают в частицы геля, и поэтому их миграция в геле замедляется. В то же время белки благодаря высокому молекулярному весу без задержки проходят через колонку с гелем сефадекса вместе с фронтом элюата.

МЕТОДИКА

1. *Подготовка колонки.* Для обессоливания 100 мл белкового раствора необходимо примерно 25 г сухого сефадекса G-25. Объем раствора, из которого требуется удалить соли, должен быть не более одной пятой объема геля, заполняющего колонку.

Сухой сефадекс суспендируют с перемешиванием в 0,05 М трис-буфере pH 7,2. После оседания частичек геля надосадочную жидкость, которая иногда может быть мутной, декантируют. Суспендирование в свежих порциях буферного раствора и отстаивание повторяют до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Затем суспензию заливают в колонку, некоторое время ждут, пока осядут частички геля, и после этого открывают выходное отверстие из колонки для того, чтобы выпустить буферный раствор, уровень которого должен достичь уровня сефадекса.

2. *Обессоливание.* Белковый раствор пропускают через гель сефадекса. Содержание белка в обессоленных фракциях определяют либо по оптической плотности при 280 нм, либо в реакции осаждения белка трихлоруксусной кислотой.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Обессоливание является одной из форм группового разделения, при котором фракционируемые соединения элюируются двумя фракциями. Одна фракция (в данном случае высокомолекулярные соединения — белки) элюируется в свободном объеме. Другая — содержащая низкомолекулярные соединения — проникает в час-

тики геля и поэтому в процессе элюирования выходит из колонки значительно позже, хорошо отделяясь от первой.

2. При групповом разделении смеси высокомолекулярные соединения не фракционируются. Гель-фильтрация в данном случае, подобно диализу, используется для отделения белков от низкомолекулярных примесей и может заменить его. Обессоливание белков можно проводить на сефадексах G-25 и G-50, а также на биогелях Р6 и Р10. Для обессоливания пептидов следует применять сефадексы G-10 и G-15 или биогели Р2 и Р4.

3. Для группового разделения целесообразно использовать короткие хроматографические колонки длиной 20—30 см. Объем геля должен не менее чем в 4 раза превышать объем обессоливаемого раствора.

Б. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ РАСТВОРОВ С ПОМОЩЬЮ СЕФАДЕКСА

Принцип метода. Сухой сефадекс, добавленный к раствору который нужно сконцентрировать, благодаря высокой гидрофильности интенсивно поглощает воду; при этом остающиеся в растворе высокомолекулярные соединения концентрируются.

Область применения. Концентрирование фракций, полученных при хроматографии, белков, выделенных другими методами фракционирования, биологических жидкостей и т. д.

МЕТОДИКА

К раствору, который должен быть сконцентрирован, добавляют сухой сефадекс G-25 (крупнозернистый), суспензию тщательно перемешивают и через 10 мин. центрифугируют или фильтруют. Каждый грамм сухого сефадекса G-25 поглощает примерно 2,5 г воды. После обработки сефадексом фильтрат или надосадочная жидкость становятся благодаря этому более концентрированными, чем исходный раствор, а рН и ионная сила их практически не меняются.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Однократное проведение описанной процедуры позволяет сконцентрировать раствор примерно в 3 раза. Если необходимо дальнейшее концентрирование, то процесс повторяют со свежей порцией сухого сефадекса.

2. Отмытый и высушенный сефадекс можно вновь использовать для концентрирования растворов.

В. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЕЙ

Принцип метода. На колонке с сефадексом G-200 фракции белков сыворотки разделяются в соответствии с их молекулярным весом.

Область применения. Фракционирование белковых смесей и очистка выделенных белковых фракций.

МЕТОДИКА

1. *Подготовка колонки с сефадексом G-200.* Размер колонки 3×80 см. Сефадекс G-200 суспендируют в 0,1 М трис-HCl pH 8,0, содержащем 0,2 М NaCl, и на сутки оставляют для набухания. Мелкие плавающие в надосадочной жидкости частицы удаляют декантацией. На дно колонки кладут фильтр из бумаги или стеклянную вату и наполняют колонку на $1/3$ высоты буферным раствором. Сначала в колонку вносят порцию сефадекса G-25, образующего слой высотой 2 см (сефадекс G-25 должен быть предварительно оставлен на сутки в буферном растворе для набухания). Затем начинают заполнять колонку разбавленной суспензией сефадекса G-200 и через несколько минут оседания открывают выходное отверстие. По мере вытекания буферного раствора продолжают заполнение колонки суспензией сефадекса, следя за тем, чтобы образующиеся при заполнении пузырьки воздуха не задерживались в столбике геля. Когда образуется столбик геля требуемой высоты, через колонку пропускают один объем буферного раствора.

2. *Нанесение сыворотки.* Открывают выходное отверстие колонки и выпускают буферный раствор до тех пор, пока его уровень в верхней части колонки не достигнет уровня геля. Затем осторожно, чтобы не взмутить верхний слой геля, на сефадекс накладывают 4—5 мл сыворотки, предварительно в течение 1 ч диализованной против буферного раствора. После того как нанесенный препарат войдет в гель, его остатки смывают тремя порциями буферного раствора по 4 мл.

3. *Элюирование.* Для элюирования через колонку пропускают в общей сложности 700—800 мл буферного раствора со скоростью 40—60 мл/ч и собирают фракции по 5 мл. Оптическую плотность элюата регистрируют либо непрерывно с помощью «Увикорда», либо спектрофотометрией каждой отдельной фракции при 280 нм.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Белки сыворотки элюируются из колонки с сефадексом G-200 тремя отдельными фракциями. В первую фракцию (соответствующую первому пику) входят высокомолекулярные белки, такие,

как макроглобулин и липопроотеиды. Вторая фракция (соответствующая второму пику) содержит белки, близкие по молекулярному весу к IgG, а именно иммуноглобулины G и A. В третьей фракции (соответствующей третьему пику) элюируются белки с меньшим молекулярным весом, такие, как альбумин и трансферрин. При фракционировании сывороток больных миеломами IgG- или IgA-типа второй пик получается очень большим. Увеличение же первого пика характерно для макроглобулинемии Вальденштрёма.

2. Для предохранения верхнего слоя геля от взмучивания во время нанесения препарата на поверхность геля можно положить кружок фильтровальной бумаги. При гель-фильтрации на сефадексах G-75, G-100, G-150 и G-200, особенно если фракционированию подвергаются белки, желательно оставлять в колонке над сефадексом немного буферного раствора, а исследуемый материал наносить под него. Это осуществимо, если плотность наносимого препарата больше плотности буферного раствора. Плотность фракционируемого белкового раствора можно увеличить, добавляя к нему соответствующее количество сахарозы.

3. Обычно гель-фильтрацию продолжают до тех пор, пока не элюируются все белки из колонки, поэтому после опыта колонку можно не отмывать. Однако все же рекомендуется перед каждым фракционированием пропустить через колонку несколько объемов буферного раствора.

4. Если колонку предполагается использовать в течение длительного времени, желательно суспендировать сефадекс в буферном растворе, содержащем мертиолат, фенол или толуол, для предотвращения бактериального роста. Сефадексы можно стерилизовать в автоклаве (при 110° C в течение 40 мин) без нарушения их свойств.

5. После того как гель сефадекса набух и отстоялся, следует тщательно удалить мелкие частицы, плавающие в надосадочной жидкости, так как они могут уменьшать скорость протекания элюента через колонку.

6. Элюирование можно также проводить раствором 0,1 M трис-HCl pH 8,0, содержащим 1 M NaCl.

Г. РАЗДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАГМЕНТОВ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЕЙ НА КОЛОНКЕ С СЕФАДЕКСОМ

При анализе структуры белков очень часто приходится сталкиваться с изучением фрагментов, полученных при ферментативном гидролизе. Препаративное разделение таких фрагментов — один из этапов исследования белков. Весьма подходящим способом разделения фрагментов ферментативно расщепленных белков можно считать гель-фильтрацию на колонке сефадекса соответствующей марки. Очень хороший пример, демонстрирующий использование

указанного метода, — разделение фракций IgG, гидролизованного папаином в присутствии или в отсутствие восстановителей. Если папаиновый гидролиз протекает в отсутствие восстановителей, то часть молекул IgG остается нерасщепленной, тогда как остальные молекулы расщепляются с образованием двух крупных хорошо изученных фрагментов (Fab и Fc) и мелких низкомолекулярных, частично способных проходить через мембрану при диализе пептидов. Молекулярный вес нативного IgG — 150 000, фрагментов Fab и Fc — около 50 000, мелкие пептиды имеют молекулярный вес 5 000 и ниже. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-100 позволяет довольно легко разделить эти три фракции папаинового гидролизата IgG.

1. *Обработка сефадекса G-100.* Соответствующее количество сухого сефадекса G-100 суспендируют в дистиллированной воде и после отстаивания мелкие плавающие в надосадочной жидкости частицы декантируют. Процедуру удаления мелких частиц повторяют несколько раз до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет совершенно прозрачной. После этого сефадекс оставляют на сутки для набухания в дистиллированной воде. Набухший гель сефадекса уравнивают 0,075 М фосфатным буферным раствором pH 7,0, содержащим 0,075 М NaCl, и загружают в колонку.

2. *Гель-фильтрация.* Для фракционирования папаинового гидролизата примерно 100 мг IgG используют колонку размером 2 × 60 см. После нанесения препарата его остатки смывают тремя порциями буферного раствора по 4 мл и начинают гель-фильтрацию со скоростью 40—60 мл/час. На кривой оптической плотности элюата появляются два следующие непосредственно друг за другом пика, а через некоторое время после них — третий пик. Фракция элюата, соответствующая первому пику, содержит негидролизированный IgG (резистентные к папаину молекулы IgG). Во фракции, соответствующей второму пику, содержатся Fab- и Fc-фрагменты. Третья фракция, соответствующая на диаграмме третьему пику, состоит из низкомолекулярных пептидов. После пропускания через колонку одного объема буферного раствора ее можно использовать вновь.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. *Выбор хроматографической колонки.* Используемые для хроматографии колонки должны иметь определенную конструкцию. Независимо от типа колонки «холостое» пространство у ее дна должно быть минимальным. Если объем «холостого» пространства довольно большой, может происходить смешивание уже разделенных фракций, что будет снижать эффективность фракционирования. Необходимо следить за тем, чтобы частицы геля не забивали поры в расположенной на дне колонки поддерживающей пористой пластинке из стекла или металла. Для этого на пористую пластинку кладут

кружок фильтровальной бумаги соответствующего размера. Очень удобны в работе колонки, изготавливаемые фирмой Pharmacia Ltd. (Швеция); они практически лишены «холостого» пространства и позволяют вести хроматографию в обоих направлениях.

2. *Длина колонки, объем наносимого препарата.* Вообще для группового разделения удобны короткие (20—30 см), а для фракционирования — более длинные (до 100 см) хроматографические колонки. При аналитической гель-хроматографии объем наносимого препарата должен быть небольшим, но все же не менее 0,02 объема геля. При препаративной гель-хроматографии стараются наносить тот максимальный объем образца, при котором еще достигается требуемая степень разделения.

3. *Диаметр колонки.* В колонках широкого диаметра (20—30 мм) «пристеночный» эффект в меньшей степени препятствует разделению, поэтому широкие колонки удобнее в работе и дают лучшие результаты, чем узкие (диаметром 10 мм и меньше) и длинные. Однако для аналитической гель-хроматографии целесообразно использовать колонки диаметром 10 мм.

4. *Заполнение колонки.* Проще всего можно заполнить колонку с помощью трубки равного с ней диаметра. Такой дополнительной трубкой следует удлинить колонку сверху примерно на одну треть ее высоты. На нижний конец колонки надевают пластмассовый капиллярный шланг такой длины, чтобы его конец можно было закрепить на 4—5 см ниже верхнего конца дополнительной трубки. Суспензии набухшего геля сефадекса дают отстояться и после этого удаляют избыток надсадочной жидкости, так чтобы оставшийся ее слой составлял примерно половину объема геля. Осторожно перемешав гель сефадекса, суспензию переливают по стеклянной палочке в колонку, удлиненную дополнительной трубкой. Рекомендуется по возможности залить в колонку в один прием весь необходимый объем суспензии. Затем сефадекс оставляют на 15—20 мин для оседания гранул и открывают кран, выпускающий буферный раствор. Скорость протекания буферного раствора при заполнении колонки должна быть ниже той скорости, которую устанавливают после нанесения препарата. Как только верхняя граница геля достигнет необходимого уровня, дополнительную трубку удаляют. Как до, так и после нанесения фракционируемого образца поверхность геля следует тщательно предохранять от повреждения. В длительных опытах постоянную скорость протекания элюента удобно поддерживать с помощью склянки Мариотта.

5. Краткое разъяснение некоторых терминов, используемых в литературе по гель-хроматографии.

V_t — общий объем столбика геля. (Рекомендуется определять общий объем геля, заполняя колонку водой и измеряя объем воды, а не с помощью вычислений, так как из-за

неровностей стенки в последнем случае результат может быть не точен.)

V_o — внешний (свободный) объем, т. е. объем жидкости, заполняющей пространство между гранулами набухшего геля. (Его можно определить, хроматографируя на колонке вещество, не способное проникать в гранулы, например голубой декстран.)

V_x — объем набухшего геля в колонке ($V_t - V_o$).

V_t — внутренний объем, т. е. объем растворителя, который находится в порах набухшего геля.

V_e — объем элюата, т. е. объем элюирующего раствора, необходимый для элюирования данного вещества.

V_s — объем разделения, т. е. объем элюирующего раствора, равный разности объемов элюатов двух разделяемых гелехроматографией веществ.

V_r — емкость по воде, т. е. максимальное количество воды (в мл), поглощаемой 1 г сухого геля.

Д. ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ НА КОЛОНКЕ С СЕФАДЕКСОМ G-50

При специфическом ферментативном гидролизе или химическом расщеплении любого белка среднего молекулярного веса получается довольно сложная смесь пептидов. Выделение и очистка всех пептидов, из которых состояла полипептидная цепь и которые содержатся в нефракционированном гидролизате, — задача достаточно трудная. Поэтому гидролизат белка рекомендуется сначала подвергнуть предварительному разделению. Среди современных методов фракционирования наиболее подходящим для этой цели является гель-фильтрация.

1. *Обработка сефадекса G-50.* Сефадекс суспендируют в 10-кратном объеме 0,01 М NH_4OH , перемешивают в течение 30 мин при комнатной температуре и оставляют для отстаивания. После этого надосадочную жидкость, содержащую мелкие частицы геля, декантируют, а суспендирование и отстаивание повторяют. Затем гель сефадекса суспендируют в 3-кратном объеме 0,01 М NH_4OH и загружают в колонку, через которую пропускают 5 объемов 0,01 М NH_4OH .

2. *Выбор размеров колонки.* Предварительное фракционирование 100—200 мг гидролизата проводят на колонке размером $1,5 \times 150$ см.

3. *Подготовка материала для фракционирования.* Фракционируемый материал следует наносить на колонку в минимальном объеме. 100—200 мг гидролизата обычно растворяют в 3—5 мл 0,01 М NH_4OH .

4. *Нанесение образца.* Открыв выходное отверстие колонки, выпускают избыток буферного раствора, так чтобы его уровень был всего лишь на 1 мм выше уровня геля сефадекса. Затем, касаясь загнутым концом пипетки стенки колонки, круговыми движениями руки наслаивают на сефадекс раствор фракционируемого материала. После этого кран выходного отверстия колонки вновь открывают и дают возможность нанесенному препарату медленно войти в гель. Остаток препарата смывают тремя порциями 0,01 M NH_4OH по 1 мл. Верхнюю часть колонки заполняют 0,01 M NH_4OH и соединяют колонку со склянкой Мариотта или насосом.

5. *Элюирование.* Элюирование производят 0,01 M NH_4OH со скоростью 300 мл/ч и собирают фракции по 3—5 мл. Фракции объединяют в соответствии с кривой оптической плотности элюата при 280 нм, полученной на «Увикорде» или после измерений в спектрофотометре. Объединенные фракции лиофилизируют.

После элюирования колонку отмывают не менее чем двумя объемами раствора 0,01 M NH_4OH и используют вновь. После 4—5 опытов фракционирования гель сефадекса необходимо извлечь из колонки и промыть раствором NH_4OH . В связи с опасностью бактериального роста не рекомендуется держать колонку при комнатной температуре.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. В соответствии с механизмом гель-фильтрации при выборе марки (G-индекса) сефадекса следует руководствоваться предполагаемой величиной молекулярного веса пептидов. Если гидролизат содержит крупные пептиды, целесообразно использовать сефадекс G-50 или G-75. Если средняя величина молекулярного веса пептидов невелика, то предварительное фракционирование проводят на сефадексе G-25. Чем выше специфичность расщепления (например, при действии трипсина на ацетил- и трифторацетилбелки или при расщеплении бромцианом), тем больше вероятность получения крупных пептидов. В этих случаях используется сефадекс с более высоким значением индекса G. При неспецифическом гидролизе (гидролиз химотрипсином, субтилизином, папаином, пепсином, кислотой и т. п.) обычно получают мелкие пептиды, которые следует предварительно фракционировать на сефадексах с низким значением индекса G.

2. Из-за абсорбционных свойств сефадекса выход материала при фракционировании гидролизатов белка обычно равен 55—60 %.

3. С помощью измерения оптической плотности растворов при 280 нм могут быть обнаружены только пептиды, содержащие тирозин и триптофан. Для выявления пептидов, не имеющих в своем составе этих аминокислот, необходимо располагать другими методами определения пептидов. К ним относится, например, метод пря-

мой спектрофотометрии при 220 нм; поглощение при этой длине волн характерно для соединений с пептидными связями.

Трудоемким, но очень чувствительным методом анализа отдельных фракций может служить нингидриновая реакция. Из каждой фракции отбирают равные пробы объемом 0,2—0,3 мл, добавляют к ним по 1 мл 2,5 н. NaOH и инкубируют 3 ч при 90° С. Затем к каждой пробе добавляют по 1 мл 30%-ной уксусной кислоты, 0,25 мл 0,2%-ного раствора SnCl_2 в 0,2 М цитратном буферном растворе и 0,25 мл 4%-ного раствора нингидрина в пропанол. Пробы на 10 мин помещают в кипящую водяную баню при 100°С, затем к каждой добавляют по 3 мл 50%-ного пропанола и определяют оптическую плотность при 570 нм.

4. Предварительное фракционирование на колонке с сефадексом очень удобно для выделения и очистки компонентов смеси, избирательно помеченных радиоактивными изотопами. В этом случае кроме определения концентрации пептидов спектрофотометрией или с помощью нингидриновой реакции, измеряют также радиоактивность полученных фракций в соответствующем приборе (в сцинтилляционном или других счетчиках).

5. Предварительное фракционирование с помощью полиакриламидного геля дает такие же результаты, как и гель-фильтрация на сефадексе. В отличие от природного декстранового геля, каким является сефадекс, полиакриламидный гель представляет собой гель синтетического полимера, обладающий чрезвычайно малыми абсорбционными свойствами. Поэтому разделение на полиакриламидном геле можно провести практически без потерь фракционируемого материала. Молекулярный вес фракционируемых веществ также очень существен для разделения на полиакриламидном геле. Чем ниже молекулярный вес компонентов разделяемой смеси, тем меньше индекс сигогеля, который целесообразно использовать для фракционирования.

Е. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НЕПРЕРЫВНО ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЕЙ

Принцип метода. Фракционируемый материал пропускают через одну и ту же колонку несколько раз; это позволяет разделить даже те компоненты смеси, которые не делятся на колонке обычной длины.

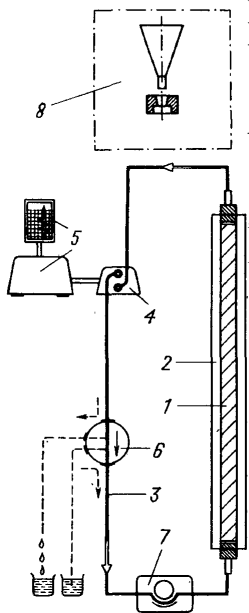
Область применения. Выделение и очистка белков.

МЕТОДИКА

1. *Оборудование.* Комплект приборов, выпускаемых фирмой LKB (Швеция) для непрерывно повторяющейся хроматографии под названием «Рецихром» (фиг. 42), состоит из следующих основных

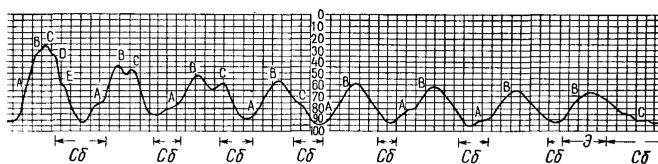
частей: хроматографическая колонка, перистальтический насос и проточный абсорбциометр.

2. *Хроматография.* Исследуемый материал наносят на колонку с сефадексом, выбранным в соответствии с молекулярным весом разделяемых веществ. Поток элюента, как показано на фиг. 42,



Фиг. 42. Схема работы системы «Рецихром».

1 — хроматографическая колонка; 2 — охлаждающая рубашка; 3 — полиэтиленовый тонкостенный капиллярный шланг; 4 — проточная кювета абсорбциометра; 5 — самописец; 6 — двухходовой распределительный кран; 7 — перистальтический микронасос; 8 — воронка для заполнения колонки с соединительной муфтой.



Фиг. 43. Очистка компонента В церулоплазмينا с помощью системы «Рецихром».

Сб — сброс нежелательных примесей; Э — элюирование нужного компонента.

устанавливают в нужном направлении соответствующим поворотом двухходового распределительного крана. Для подачи элюента на колонку снизу вверх в систему включен перистальтический насос. С помощью этой системы можно повторно пропускать фракционируемый образец через колонку. Оптическая плотность фракций непрерывно регистрируется самописцем. В процессе разделения белков при соответствующих поворотах распределительного крана сначала из препарата удаляют примесные (нежелательные) фракции, а затем выделяют совершенно гомогенную белковую фракцию (фиг. 43). В комплект входят колонки размером $3,2 \times 105$ и $3,2 \times 65$ см. С помощью перистальтического насоса можно устанавливать скорость протекания раствора от самой малой до 80 мл/ч.

Рекомендуемая литература

- Determan H.*, Gel Chromatography, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968. (Г. Детерман, Гель-хроматография, изд-во «Мир», М., 1970.)
Leach S. J., Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, Academic Press, New York, London, 1969.
Williams C. A., Chase M. W., Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. II, Academic Press, New York, London, 1968.

Глава XI

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

(Д. А. МЕДЬЕШИ)

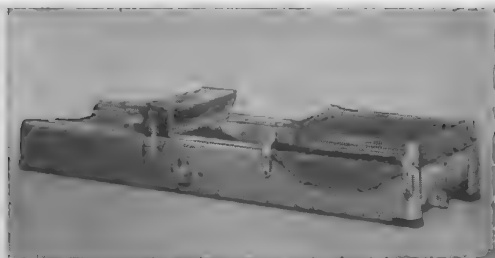
Смеси можно хроматографировать не только на колонках пористого геля, но и в однородном тонком слое адсорбента. Тонкослойная хроматография получила широкое распространение в современной лабораторной практике начиная с 1956—1958 гг. после того, как Сталь [16] описал простую стандартную методику приготовления тонкого слоя адсорбента.

В тонком слое адсорбента, главным образом силикагеля или окиси алюминия, можно проводить микроанализ смеси липофильных веществ так же просто, как и хроматографией на бумаге. Область применения этого метода быстро расширялась, и в настоящее время с его помощью проводят анализ гидрофильных соединений, которые можно фракционировать и на бумаге, но тонкослойная хроматография на порядок чувствительнее и проходит значительно быстрее.

Для приготовления слоя готовят густую водную суспензию адсорбента и наносят ее на пластинку из стекла, пластмассы или алюминиевой фольги. В продаже имеется специальный прибор для нанесения слоев адсорбента строго воспроизводимой толщины (фирмы Desaga и Camag). В прибор любой конструкции входит лоток, заполняемый гелем, один край которого (наносящий край) установлен на соответствующем расстоянии от стеклянной пластинки. Изменяя это расстояние, можно наносить слои адсорбента различной толщины. При движении пластинки относительно лотка (в приборе фирмы Desaga) или лотка относительно пластинки (в приборе фирмы Camag) тщательно отшлифованная поверхность стекла покрывается ровным слоем влажного адсорбента (фиг. 44). Существует два типа данных приборов — с ручным и механическим управлением передвижения пластинки. В приборе венгерской фирмы Labor стеклянная пластинка скользит под давлением водопроводной воды.

После нанесения слоя адсорбента пластинки высушивают на воздухе и далее обрабатывают согласно выбранной методике (например, прогревают при 60—120° С, «активируют» и т. д.). Прогретые пластинки можно хранить в эксикаторе.

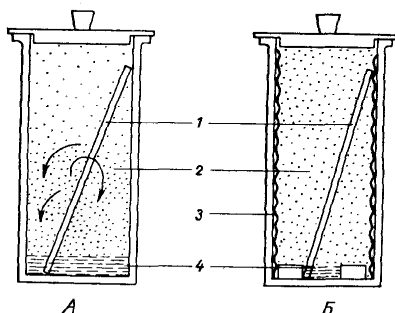
Исследуемый препарат наносят на пластинку микропипеткой в одну точку или по линии. Линия получается при нанесении ряда



Фиг. 44. Прибор для нанесения слоя носителя на пластинки для тонкослойной хроматографии.

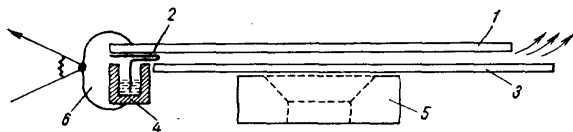
точек или с помощью имеющегося в продаже специального шприца. В довольно широких пределах количество наносимого материала не влияет на миграцию разделяемых веществ. Однако, если на пластинку нанести слишком много материала, возможна деформация пятен. Пределы разрешения и оптимальное количество наносимого препарата в каждом конкретном случае варьируют в зависимости от свойств адсорбента и фракционируемой смеси.

Обычно проводят восходящую тонкослойную хроматографию, используя для этого стеклянные хроматографические камеры с крышками, обеспечивающими герметичность. Растворитель наливают на



Фиг. 45. Хроматографическая камера и ее насыщение парами растворителя. А. Камера с жидкой фазой, налитой на дно. Б. Камера, стенки которой выстланы фильтровальной бумагой, смоченной жидкой фазой, для создания равномерно насыщенной парами растворителя атмосферы. 1 — пластинка с нанесенным слоем адсорбента; 2 — пары растворителя; 3 — смоченная растворителем фильтровальная бумага; 4 — многокомпонентный растворитель.

дно такой камеры и погружают в него нижний край хроматографической пластинки (фиг. 45). При тонкослойной хроматографии приходится учитывать особенность, не встречающуюся при хроматографии на колонке, — испарение растворителя с поверхности слоя, в результате которого увеличивается время миграции данного вещества. Из растворителя, имеющего сложный состав, в первую очередь испаряются наиболее летучие компоненты, что ведет к из-



Фиг. 46. Схема горизонтальной хроматографической камеры Бреннера и Нидервизера (BN-камера).

1 — покрывная пластина; 2 — фитиль из фильтровальной бумаги, подающий растворитель на слой адсорбента; 3 — пластина, используемая в качестве подложки для слоя адсорбента; 4 — резервуар для растворителя; 5 — поддерживающий камеру корпус; 6 — пружинный зажим.

менению исходного соотношения компонентов смеси. Интенсивность испарения снижается в направлении от краев к центру пластинки, поэтому происходит искривление фронта растворителя, и в результате величина R_f на краях хроматограммы будет больше, чем в центре. Испарение растворителя при тонкослойной хроматографии ухудшает воспроизводимость величины R_f . Чтобы устранить этот источник артефактов, следует постоянно поддерживать в камере атмосферу насыщенных паров. Это достигается выстиланием стенок камеры фильтровальной бумагой, смоченной растворителем, или уменьшением до минимума объема хроматографической камеры (сэндвич-камера).

Существует несколько способов дальнейшего улучшения разделения при тонкослойной хроматографии. Например, можно повторно подавать тот же самый растворитель на пластинку или, прервав хроматографию на определенном этапе, после того как разделяемые вещества уже мигрировали на некоторое расстояние, высушить пластинку и затем продолжать хроматографию с другим растворителем. Для длительной хроматографии Бреннером и др. [4] предложена специальная камера, представленная на фиг. 46. В этом приборе хроматографическая пластинка расположена горизонтально, а растворитель подается на один край пластинки с помощью фитилей из фильтровальной бумаги. Почти вся поверхность пластинки закрыта крышкой, за исключением полосы шириной 2 см на противоположном по отношению к сосуду с растворителем конце. Растворитель испаряется со свободной поверхности этого конца

пластинки, чем обеспечивается постоянный ток элюента, и поэтому хроматографию можно вести как угодно долго.

Подобно хроматографии на бумаге, при тонкослойной хроматографии также проводят разделение в двух направлениях под прямым углом друг к другу. В одном направлении, как правило, проводят электрофорез в электрофоретической камере с малым объемом для испарения; контакт между слоем адсорбента и электродными отсеками в этих камерах обеспечивают фитили из фильтровальной бумаги. Из-за низкой теплопроводности стекла и связанным с этим слабым тепловым рассеянием может возникать проблема охлаждения хроматографической пластинки. Для снижения образования тепла рекомендуется работать на стеклянных пластинках минимальной толщины и применять буферные растворы по возможности минимальной ионной силы.

Полученные фракции проявляют, опрыскивая тонкий слой соответствующими реагентами. При работе на неорганических адсорбентах в качестве таких реагентов могут быть использованы вещества, обычно разрушающие бумагу, например сильные кислоты.

Проявленные хроматограммы, как правило, фотографируют. После опрыскивания специальным раствором полимеров (Neatan) слой адсорбента можно отделить от стекла и сохранить в качестве иллюстрирующего материала эксперимента.

А. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Для фракционирования аминокислот применяется хроматография в тонком слое силикагеля или целлюлозы. В отношении отдельных аминокислот для хроматографии на силикагеле характерна большая чувствительность, чем для хроматографии на целлюлозе, однако в тонком слое целлюлозы разделение лучше. В связи с этим ниже приводится метод Аркса и Неера [2] разделения аминокислот тонкослойной хроматографией на целлюлозе.

Приготовление слоя адсорбента. 8,0 г порошка целлюлозы MN 300 (фирма Macherey-Nagel, ФРГ) суспендируют в гомогенизаторе в смеси 48 мл дистиллированной воды и 2 мл этанола. Полученной суспензии достаточно для нанесения на 5 пластинок с толщиной слоя 0,25 мм. Пластины с целлюлозой оставляют на ночь для подсушивания при комнатной температуре.

Для двумерного разделения используют 4 смеси растворителей, которые применяют в трех разных комбинациях: 1) *n*-бутиловый спирт — ацетон — диэтиламин — вода (10 : 10 : 2 : 5), 2) изопропанол — муравьиная кислота — вода (40 : 2 : 10), 3) *втор*-бутиловый спирт — 2-бутанон (метилэтилкетон) — дициклогексилламин — вода (10 : 10 : 2 : 5), 4) фенол — вода (75 : 25) в атмосфере 3%-ного NH_4OH .

Растворитель (1) всегда применяют при разделении в первом, а любой из трех остальных растворителей — во втором направлении. Фракционирование проводят в обычной хроматографической камере, не выстилая ее стенок фильтровальной бумагой, смоченной растворителем. Растворитель наливают в камеру непосредственно перед опытом. Уровень растворителя должен быть на 15—20 мм ниже стартовой точки. Хроматографию продолжают до тех пор, пока фронт растворителя не достигнет верхнего края пластинки. После этого пластинку высушивают 5—10 мин при 90°C или 12 ч при комнатной температуре. На втором этапе разделения рядом со стартовой точкой наносят стандартную смесь аминокислот и помещают пластинку в камеру со второй смесью растворителей. По окончании хроматографии пластинку 20 мин высушивают при 90°C.

Полученные хроматограммы рекомендуется проявлять нингидрин-коллидиновым реагентом (1,0 г нингидрина, растворенного в смеси 700 мл этанола, 29 мл 2,4,6-коллидина и 210 мл уксусной кислоты). При окрашивании этим реагентом можно обнаружить следующие минимальные количества аминокислот: 0,05 мкг для Ала, Асп и Валь; 0,1—0,2 мкг для Иле, Сер и Арг; 0,3—0,5 мкг для Гис, Лиз, Мет и Тир.

Найбом [13] на первом этапе разделения в тонком слое целлюлозы MN 300 проводил электрофорез в течение 15 мин в 0,7%-ной муравьиной кислоте при напряжении 400 В, а на втором — хроматографию в перпендикулярном направлении в смеси бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 2).

1. ДНФ-АМИНОКИСЛОТЫ

Силикагель хорошо зарекомендовал себя в качестве носителя для тонкослойной хроматографии ДНФ-аминокислот.

Примерно 25—30 г силикагеля суспендируют в 60—65 мл дистиллированной воды и растирают в фарфоровой ступке до получения гомогенной массы. Этого количества силикагеля достаточно для 5 пластинок размером 20 × 20 см с толщиной слоя 0,25 мм. Если используют носитель, содержащий сульфат кальция (кизельгель G), растирание и насаивание его занимает не более 1—1,5 мин. Силикагель, не содержащий сульфата кальция (кизельгель H), дает стабильный слой толщиной до 0,25 мм. Для хроматографии аминокислот и их производных используют пластинки, высушенные на воздухе без нагревания.

Для фракционирования ДНФ-аминокислот предложено несколько различных методик. Водно- и кислоторастворимые ДНФ-аминокислоты можно разделить с помощью одномерной хроматографии, используя в качестве растворителя смесь *n*-пропилового спирта и 37%-ного раствора NH_4OH (7 : 3, по объему). Препарат наносят на пластинку в растворе уксусной кислоты или 0,5 н. HCl ,

однако до начала хроматографии необходимо удалить кислоту. Для этого хроматографическую пластинку перед нанесением нагревают до 60°C и наносят разделяемую смесь на горячий носитель.

Эфирорастворимые ДНФ-аминокислоты также могут быть разделены с помощью двумерной хроматографии на силикагеле в следующих системах растворителей: 1) толуол — пиридин — этиленхлоргидрин — 0,8 н. NH_4OH (100 : 30 : 60 : 60), верхняя фаза используется в качестве элюента при хроматографии, нижняя — для предварительной обработки слоя носителя; 2) хлороформ — бензиловый спирт — уксусная кислота (70 : 30 : 3); 3) бензол — пиридин — уксусная кислота (80 : 20 : 2); 4) хлороформ — метанол — уксусная кислота (95 : 5 : 1).

На первом этапе разделения используется система (1). Боковые стенки хроматографической камеры выстилают фильтровальной бумагой, смоченной в нижней фазе этого растворителя. Две стеклянные пластинки покрывают силикагелем и помещают в камеру так, чтобы слой геля был обращен к фильтровальной бумаге, но не контактировал с ней.

Пластинки оставляют в камере до следующего дня, извлекают из камеры и тотчас сверху прикрывают слой адсорбента другой стеклянной пластинкой таким образом, чтобы на одном конце первой пластинки оставалась незакрытой полоска шириной 15 мм. На нее как можно быстрее наносят фракционируемый материал и немедленно погружают пластинку в растворитель [верхняя фаза системы (1)]. После того как фронт растворителя пройдет 15 см, пластинку извлекают из камеры, 3 мин подсушивают на воздухе и вновь погружают в тот же самый растворитель. После второй хроматографии в том же направлении пластинку 10 мин подсушивают струей воздуха, на 10 мин помещают в термостат при 60°C и затем охлаждают в струе воздуха в течение 10—15 мин. После этого сразу же проводят разделение в перпендикулярном направлении. При использовании в качестве элюента систем растворителей (3) и (4) длительная горизонтальная хроматография продолжается 2—3 ч (см. рис. 46).

3. ФТГ-АМИНОКИСЛОТЫ

Тонкослойная хроматография на силикагеле оказалась весьма полезной для идентификации фенилтиогидантоиновых производных аминокислот (ФТГ-аминокислот). Для предварительного определения этих соединений Бреннер и др. [4] рекомендовали двумерное разделение сначала в смеси хлороформ—метанол (9:1) и затем в смеси хлороформ — муравьиная кислота (100 : 5). Чтобы идентифицировать ФТГ-аминокислоты, на той же хроматографической пластинке фракционируют стандартные растворы известных аминокислот.

Хроматографию ФТГ-аминокислот можно проводить и в других растворителях. Пятна, образуемые аминокислотами, проявляются хлортолидиновым реактивом.

3. ДАНСИЛАМИНОКИСЛОТЫ

Очень чувствительным методом идентификации аминокислот является тонкослойная хроматография их диметиламинафталин-5-сульфонильных производных (гл. XIII). Для фракционирования их на силикагеле можно, например, воспользоваться следующими системами растворителей: хлороформ — бензиловый спирт — уксусная кислота (100 : 30 : 3); бензол — пиридин — уксусная кислота (80 : 20 : 2); 2-бутанон — пропионовая кислота — вода (15 : 5 : 6).

Применяя подходящие растворители и стандартные растворы дансиламинокислот, можно идентифицировать дансильные производные всех аминокислот. Вудс и Ванг [19] сообщили о том, что использование полиамидных слоев, связанных с полиэфирной подложкой, чрезвычайно эффективно при разделении дансиламинокислот (гл. XIII). Можно добиться вполне удовлетворительных результатов фракционирования с помощью двумерной хроматографии сначала в смеси вода — 90%-ная муравьиная кислота (200 : 3), а затем в смеси бензол — ледяная уксусная кислота (9 : 1).

Локализацию дансиламинокислот определяют на влажной хроматограмме по их собственной флуоресценции в ультрафиолете при 360 нм. Этот способ позволяет выявлять до 10^{-4} мкмольа дансиламинокислот [15]. После высушивания хроматографической пластинки интенсивность флуоресценции значительно снижается.

4. ПЕПТИДЫ

Ряд авторов с успехом использовали хроматографию в тонком слое для анализа ферментативных гидролизатов белков [3, 7, 16, 17]. Двумерной хроматографией можно получить пептидные карты в системах: хлороформ — метанол — 25%-ный NH_4OH (2 : 2 : 1) и пиридин — уксусная кислота — бутанол — вода (40 : 14 : 68 : 25) (двукратная хроматография).

В качестве носителя рекомендуется использовать силикагель марки кизельгель S (фирма Macherey-Nagel, ФРГ). Перед опытом слой силикагеля в течение 30 мин прогревают при 110°C и после первого разделения прогревание повторяют. Чаще всего тонкослойную хроматографию комбинируют с электрофорезом.

Обычно пептидная карта может быть получена за 5—10 ч. Ричард [14], анализируя триптический гидролизат миозина хроматографией в тонком слое силикагеля (кизельгель G), на первом этапе использовал горизонтальную продолжительную хроматографию в

смеси хлороформ — метанол — 34%-ный NH_4OH (2 : 2 : 1). На втором этапе разделения был проведен электрофорез в смеси пиридин — уксусная кислота — вода (1 : 10 : 489) в течение 1 ч при напряжении 980 В. Балье и др. [3] проанализировали триптический гидролизат восстановленного и алкилированного IgG человека с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля марки кизельгель G (фирма Merck, ФРГ), содержащего 0,5% амилопектина. Слой носителя после приготовления хроматографической пластинки был высушен на воздухе. До опыта пластинки хранили в эксикаторе, а затем использовали их без прогревания. На первом этапе разделения была применена продолжительная проточная хроматография в смеси пропанол — этанол — концентрированный аммиак — вода (20 : 60 : 2 : 20) в течение 7—8 ч. После этого пластинку подсушивали при 60°C и подвергали электрофорезу в том же буферном растворе, который использовал Ричард [14], в течение 50 мин при напряжении 1000 В.

Б. ТОНКОСЛОЙНАЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ

Тонкослойный вариант гель-фильтрации был предложен Детерманом [6], а также Йоханссоном и Римо [11] и оказался весьма полезным для микроанализа и быстрого сравнительного анализа нескольких образцов исследуемого материала. Эндриус [1], а позднее Моррис [12] применили тонкослойную гель-фильтрацию для определения молекулярного веса белков на основе установленной ими линейной зависимости между логарифмом молекулярного веса данного белка и расстоянием, пройденным им в слое данного носителя за определенный промежуток времени. В соответствии с этим можно ориентировочно определять молекулярные веса неизвестных белков, если одновременно проводить гель-фильтрацию стандартных белков известного молекулярного веса. Когда исследователь располагает достаточно чувствительными методами обнаружения белка в слое носителя, для определения молекулярного веса достаточно всего лишь нескольких микрограмм исследуемого материала. При определении молекулярного веса белков гель-фильтрацией в тонком слое следует иметь в виду, что подвижность данного белка при хроматографии в гель зависит не только от молекулярного веса, но и от формы его молекул. Поэтому определение молекулярного веса с помощью гель-хроматографии правомерно лишь в том случае, когда форма молекул исследуемого белка незначительно отличается от формы молекул стандартных белков, используемых для калибровки.

Для тонкослойной гель-фильтрации слой носителя готовят из самых мелких гранул геля. Из препаратов, имеющих в продаже, применяются гели декстрана марки сефадекс «сверхтонкий» или полиакриламидные биогели марки «—400 меш». В описанных в литературе методиках тонкослойной гель-хроматографии в основном

рекомендуется пользоваться сефадексом, но биогели в данном случае подобны сефадексам.

Набухание гелей происходит в тех же условиях и осуществляется так же, как и при подготовке более крупных частиц геля для колоночной хроматографии. Целесообразно при набухании геля использовать больший объем раствора, чем минимально необходимый согласно емкости по воде, а перед нанесением на пластинку удалять избыток жидкости над гелем.

Наиболее подходящая толщина слоя носителя — 0,5 мм. Для нанесения носителя на пластинки могут быть использованы описанные выше приборы, позволяющие получать слой разной толщины. Если суспензию носителя раскатывать стеклянной палочкой, на обоих концах которой наклеено несколько витков изоляционной ленты, также образуется достаточно ровный слой. Свежеприготовленные пластинки в течение 20—25 мин подсушивают на воздухе. Их можно довольно долго хранить во влажной камере, если исключена возможность бактериального роста. При нисходящей тонкослойной гель-фильтрации пластинку располагают в камере под углом 10—15°. Как правило, гель-фильтрацию проводят в водных растворах, поэтому хроматографическая камера может быть изготовлена из пластмассы. Она состоит из кюветы для буферного раствора, рамки, поддерживающей пластинку под соответствующим углом, и крышки. Подача буферного раствора на пластинку осуществляется с помощью фитиля из фильтровальной бумаги. В качестве маркеров удобно использовать окрашенные высокомолекулярные вещества (например, меченные флуоресцеином ферритин или γ -глобулин), которые не задерживаются частицами геля. Гель-фильтрацию проводят до тех пор, пока маркер не пройдет по крайней мере 10 см от линии старта. После этого пластинку извлекают из рамки и покрывают слой носителя листом фильтровальной бумаги (например, Шляйхер-Шуль 2043 или ватман 3 ММ), вырезанным по размеру пластинки. Некоторые исследователи рекомендуют применять в этом случае лист сухой фильтровальной бумаги. В нашей лаборатории используется смоченная и тщательно отжатая фильтровальная бумага, так как с ее помощью легче прикрыть слой носителя без образования под бумагой пузырьков воздуха. После этого бумагу снимают (иногда вместе с частичками геля), высушивают при температуре около 120°C и окрашивают красителями, выявляющими белок, или реактивом Паули. Наряду с другими красителями можно воспользоваться, например, амидовым черным 10В, кислым фуксином и т. п. Во время отмывания несвязавшегося красителя частички геля отделяются от бумаги, и после высушивания она может быть использована для документации.

В нашей лаборатории гель-фильтрация в тонком слое сефадекса G-150 используется для анализа фрагментов молекул иммуноглобулинов, полученных при ферментативном гидролизе. 5,0 г се-



Фиг. 47. Гель-фильтрация ферментативно расщепленного IgG человека в тонком слое сефадекса G-150.

Пятна слева: папаиновый гидролизат, полученный без предварительного окисления SH-групп (сверху нерасщепленный белок, внизу — смесь фрагментов Fab и Fc); пятно посередине — $F(ab')_2$ -фрагменты, полученные при гидролизе пепсином; пятно справа — смесь фрагментов Fab и Fc, полученных при гидролизе папаином.

фадекса G-150 оставляют для набухания в 150 мл буферного раствора (0,075 M фосфатный буферный раствор pH 7,0, содержащий 0,075 M NaCl). Через 5—6 ч гель-фильтрации гидролизат делится на фракцию нерасщепленного IgG, фракцию двухвалентных фрагментов (5S) и фракцию одновалентных фрагментов (3,5S), четко различимых на хроматограмме (фиг. 47).

Комбинированное использование тонкослойной гель-фильтрации с электрофорезом или иммунодиффузией до настоящего времени представляет собой один из наиболее тонких методов микроанализа белков. Хансон и др. [10] разработали метод двумерного разделения, используемый для анализа белков. На первом этапе белки подвергают гель-фильтрации в тонком слое сефадекса G-200 или G-100, а на втором — электрофорезу. Они предложили прибор, в котором хроматографическую пластинку можно закреплять под углом для гель-фильтрации и горизонтально для электрофореза. В описанных экспериментах использовали стеклянные пластинки размером 30×30 см и толщиной 1 мм, на которые наносили слой геля сефадекса толщиной 0,5 мм. Для набухания сефадекса оставляли в 0,05 M вероналовом буферном растворе pH 8,6. Сначала проводили гель-фильтрацию, а затем в направлении, перпендикулярном первому, в течение 3 ч вели электрофорез при градиенте напряжения 10 В/см. Этот метод весьма успешно был применен для анализа сывороток крови человека, спинномозговой жидкости и гормона роста.

Грант и Эвералл [8] и Хансон и др. [10] предложили методику иммуно-гель-фильтрации. После проведения гель-фильтрации сефадекса, расположенный по обе стороны от области разделения ис-

следующей смеси, удаляют и освободившуюся поверхность пластинок, а также оставшийся слой сефадекса заливают расплавленным и охлажденным до 50° С 1%-ным агаром. После затвердения агара в нем вырезают канавки, которые заполняют соответствующей иммунной сывороткой. Все последующие этапы методики ничем не отличаются от обычного иммуноэлектрофореза [10]. Более поздняя модификация метода [9] позволяет проводить количественный иммунохимический анализ разделенных в тонком слое сефадекса фракций. По окончании гель-фильтрации слой сефадекса покрывают пластинкой геля агарозы, содержащего соответствующие антитела. В результате взаимодействия фракционированных белков с антителами образуются кольца преципитации, подобные тем, которые наблюдаются при радиальной иммунодиффузии.

Описан также метод, который в принципе представляет собой обратную модификацию методики, упомянутой выше [5]. Сначала готовят агаровую пластинку, в которой затем вырезают полоски геля и, удалив их, освободившееся место заполняют суспензией сефадекса. После этого проводят гель-фильтрацию в образованных таким образом слоях сефадекса. Дальнейшие этапы те же, что и при иммуноэлектрофорезе.

Цитированная литература

1. Andrews P., Biochem. J., **91**, 222 (1964).
2. Arx E. V., Neher R., J. Chromatogr., **12**, 329 (1963).
3. Ballieux R. E., Sebens T., Mul N. A., Protides Biol. Fluids, **14**, 527 (1966).
4. Brenner M., Niederwieser A., Pataki G., Experientia, **17**, 145 (1961).
5. Carnegie P. R., Pacheco G., Proc. Soc. Exp. Biol., **117**, 137 (1964).
6. Determan H., Experientia, **18**, 430 (1962).
7. Gelotte B., Flodin P., Killander J., Arch. Biochem. Biophys., Suppl., No. 1, 319 (1962).
8. Glaesmer R., Ruckpaul K., Jung W., Z. Med. Labortech., **6**, 175 (1965).
9. Grant G. H., Evarall P. H., J. Clin. Path., **18**, 654 (1965).
10. Hanson L. A., Holmgren J., Wadsworth C., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **40**, 806-819 (1971).
11. Hanson L. A., Johansson B. G., Rymo L., Clin. Chim. Acta, **14**, 391 (1966).
12. Johansson B. G., Rymo L., Acta Chim. Scand., **18**, 217 (1964).
13. Morris C. J. O. R., J. Chromatogr., **16**, 167 (1964).
14. Nybom N., Physiol. Plantarum, **17**, 434 (1964).
15. Ritschard W. J., J. Chromatogr., **16**, 327 (1964).
16. Seiler N., Weichmann J., Experientia, **20**, 559 (1964).
17. Stahl E., Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook, Springer, Berlin, 1969.
18. Stegemann H., Lerch B., Anal. Biochem., **9**, 417 (1964).
19. Wieland T., Georgopoulos D., Biochem. Z., **340**, 476 (1964).
20. Woods K. R., Wang K. T., Biochim. Biophys. Acta, **133**, 369 (1967).

Рекомендуемая литература

Pataki G., Dünnschichtchromatographie in Aminosäure- und Peptidchemie, Walter de Gruyter, Berlin, 1966.

Randerath K., Thin Layer Chromatography, Academic Press, New York, 1965.

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В ФИКСИРОВАННОМ СЛОЕ ИОНООБМЕННИКА¹

Ионообменная тонкослойная хроматография в фиксированном слое ионообменной смолы — новый метод в биохимии. Бесспорно, в настоящее время среди известных способов фракционирования ионообменная хроматография является лучшим. В течение двух последних десятилетий это было подтверждено многочисленными экспериментами.

Ионообменная хроматография дала возможность автоматизировать анализ аминокислот, что открыло новую эпоху в биохимии белка и ряде других областей молекулярной биологии. Однако при применении классической ионообменной хроматографии на колонках чрезвычайно большую роль играет фактор времени. Основные проблемы в методах хроматографии на колонке возникают при оценке фракционирования и проведении параллельных экспериментов.

Из характера метода следует, что для оценки требуется сложная по конструкции и дорогая полуавтоматическая или автоматическая аппаратура. Если же ее нет, неавтоматическое фракционирование, при котором каждую фракцию из коллектора нужно отдельно проанализировать, требует больших затрат времени.

Производительность автоматического аминокислотного анализатора определяется числом анализируемых проб за данный промежуток времени; совершенно очевидно, что она значительно превышает производительность неавтоматического фракционирования.

Ясно, что для проведения параллельных опытов нужно иметь либо несколько автоматических установок, что с финансовой точки зрения допустимо лишь для небольшого числа лабораторий, либо большой штат научных сотрудников. Однако во многих случаях возникает необходимость проведения большого числа анализов. Например, при исследовании структуры белка для определения полной аминокислотной последовательности белка со средним молекулярным весом требуется проделать около 3—4 тыс. анализов.

¹ Данная глава прислана Т. Дэвени специально для русского издания.—
Прим. ред.

Приблизительно столько же испытаний необходимо провести при селекции растений для отбора одного нового вида с повышенным содержанием белка или более высоким содержанием Лиз и Мет. В клинической практике также имеется область, где анализ аминокислот используется в массовых обследованиях для выявления нарушений аминокислотного метаболизма у новорожденных. Во многих странах такое обследование уже введено в обязательном порядке, правда, с применением микробиологических методов, поскольку исследование огромного числа образцов другими методами аминокислотного анализа реально не выполнимо.

Ясно, что в таких исследованиях метод колоночной хроматографии неприменим, тогда как тонкослойная хроматография — очень простая, быстрая и удобная процедура, при которой разделяемые вещества обнаруживаются достаточно легко; она не требует дорогостоящей аппаратуры и применима для массовых испытаний. Правда, ее разрешающая способность значительно уступает колоночной ионообменной хроматографии. Несмотря на это, относительно молодая методика быстро распространяется во всех областях химии, и это не случайно.

Для разделения, например, смеси из 16 аминокислот хроматографию в тонком слое, как и хроматографию на бумаге, необходимо проводить в двух направлениях. Это снижает ценность метода, так как двумерные хроматограммы довольно трудно оценивать, особенно когда в пробе имеется больше 16 аминокислот. К тому же при хроматографии в двух направлениях для каждой пробы необходима отдельная пластинка, а это создает дополнительные сложности, связанные с рабочим местом, обработкой хроматограмм и т. д.

Высокая разрешающая способность ионообменной хроматографии и простота тонкослойной хроматографии породили стремление объединить эти два метода и разработать технологию тонкослойной хроматографии в фиксированном слое ионообменника.

Вначале казалось, что осуществить это довольно легко. В тонкослойной хроматографии применяются различные сорбенты (силикагель, окись алюминия, полиамид, различные производные целлюлозы и т. д.) и различные связывающие агенты (гипс, крахмал, декстран, поливиниловый спирт и т. д.). Предполагали, что эти агенты и условия, при которых они применяются, вполне подходящи и для фиксирования смол.

К сожалению, первые эксперименты показали, что дело обстоит не так просто, и для того чтобы проводить хроматографию в слое ионообменника, необходимо разрешить следующие проблемы:

1. Слой должен быть крепким. Его механическая прочность должна быть подобна прочности слоев силикагеля, т. е. он должен быть таким, чтобы его можно было брать руками, писать на нем мягким грифелем и хранить сложенным в стопку.

2. Ионобменная хроматография возможна только в водных растворах: следовательно, слой должен быть влагопрочным.

3. Связывающее вещество не должно уменьшать набухания фиксированного ионобменника (определяемого емкостью) и его разрешающей способности.

4. Слой должен сохранять прочность в органических растворителях, потому что выявление фракционируемых компонентов (например, в реакции с нингидрином) обычно ведут с их использованием (ацетон, бутанол и т. д.).

Нам удалось разработать способ приготовления слоя ионобменной смолы со связывающим веществом, отвечающего всем необходимым требованиям, и найти условия для хроматографии в нем. Наш способ был принят заводом *Chinoin-Nagyutétény* (Венгрия) и фирмой *Machery-Nagel* (ФРГ).

В настоящее время в продажу поступили пластинки «Фиксион» венгерского производства и «Ионэкс» немецкого производства.

ТИПЫ ПЛАСТИНОК «ФИКСИОН»

Для приготовления фиксированного слоя ионобменника в качестве подложки можно использовать стеклянную или пластмассовую пластинку. Слой на стеклянной подложке более удобен, чем слой, фиксированный на пластмассе, так как стекло обладает жесткостью, а пластмассовая пластинка слишком эластична и поэтому может изгибаться под тяжестью нанесенного ионобменника. В связи с этим пластмассовую подложку приходится дополнительно закреплять, и, кроме того, при ее использовании возникают нежелательные электростатические «пристеночные эффекты».

Тем не менее слои, фиксированные на пластмассе, обладают рядом достоинств, немаловажных для экспериментатора. Размеры стеклянных пластинок стандартны (20×20 или 10×20 см), тогда как пластмассовую пластинку, покрытую слоем, можно разрезать ножницами на части любого размера. Это особенно важно, когда экспериментатор подбирает подходящий буферный раствор для нового метода.

В принципе для приготовления тонкого слоя годится любой тип смолы. Одна из пластинок — «Фиксион 50×8 » — имеет слой сильного катионообменника, фиксированный на пластмассовой пленке. Цифры в названии пластинки указывают на тип смолы: в данном случае — это смола дауэкс 50×8 в Na^+ -форме, специально полученная для тонкослойной хроматографии.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАСТИНОК «ФИКСИОН 50×8 »

При использовании пластинок «Фиксион 50×8 » надо иметь в виду следующее:

А. В проводимых исследованиях, например при разделении аминокислот, необходимо обеспечить условия (буферный раствор, молярность, pH, температура), близкие к тем, которые применяются при хроматографии на колонке, так как функциональным компонентом слоя является тот же материал, который используется для колоночной хроматографии, т. е. сильный катионообменник.

Б. При хроматографии, высушивании, нанесении пробы, проявлении, оценке разделения, документации и т. д. можно применять ранее разработанные хорошо известные способы тонкослойной хроматографии. Например, для разделения основных аминокислот в аминокислотном анализаторе применяют буфер, имеющий концентрацию Na^+ 0,35 М и pH 5,23; этот же буфер пригоден для разделения основных аминокислот на пластинке «Фиксион 50 × 8». При этом, кроме основных, хорошо разделяются и идентифицируются ароматические аминокислоты Тир и Фен.

При разделении основных и ароматических аминокислот операции проводят в следующей последовательности:

1. На пластинке мягким карандашом отмечают линию старта (примерно на расстоянии 1,5 см от нижнего края).

2. Исследуемый образец наносят капилляром. Если необходимо нанести довольно большой объем разбавленного раствора, применяют подсушивание феном.

3. Пластинку помещают в герметичную хроматографическую камеру, на дне которой находится слой буферного раствора высотой 1 см.

4. Хроматографию проводят при комнатной температуре до тех пор, пока фронт буферного раствора не поднимется на высоту 15 см.

5. Пластинку извлекают из камеры и высушивают феном.

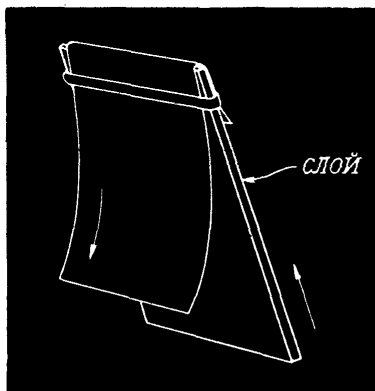
6. Пластинку опрыскивают раствором нингидрина в ацетоне и высушивают феном. Нагревание пластинки в течение нескольких минут способствует появлению пятен.

В некоторых случаях (например, при разделении смеси 16 аминокислот) пластинку «Фиксион» перед использованием необходимо уравновесить буферным раствором. При уравновешивании, как и при колоночной хроматографии, создается соответствующая ионная среда и удаляются возможные примеси, находящиеся в слое. Буферные растворы следует готовить на деионизованной воде.

В хроматографическую камеру стандартных размеров заливают 100 мл буферного раствора; при этом слой жидкости на дне должен иметь высоту 1—1,5 см. Такого количества буферного раствора достаточно для проведения хроматографии на 3 пластинках. В одну камеру одновременно можно поставить 2—3 пластинки.

УРАВНОВЕШИВАНИЕ ПЛАСТИНОК «ФИКСИОН 50 × 8»

Для ионообменной хроматографии используется смола в соответствующей ионной форме. При колоночной хроматографии смолу сначала переводят из одной формы в другую (например, из H^+ - в Na^+ -форму), а потом колонку уравнивают стартовым буферным раствором. При работе с пластинками «Фиксион 50 × 8» первой стадии, т.е. перевода из одной формы в другую, не требуется, так



Фиг. 48. Уравнивание пластинок «Фиксион».

как слой готовят из особо чистой смолы, которая уже находится в Na^+ -форме. Однако в некоторых случаях уравнивание смолы необходимо, особенно при разработке новых методов. Оно осуществляется довольно просто — проточной хроматографией при непрерывной подаче буферного раствора. Пластинку «Фиксион 50 × 8» накладывают обратной стороной на стекло такого же размера. Складывают 4 листа фильтровальной бумаги (размером 20 × 15 см), с одного конца загибая полоску шириной 1 см, и прикладывают их к верхнему краю пластинки так, чтобы загнутая односантиметровая полоска

бумаги покрыла слой ионообменника; ее прикрепляют к пластинке резиновой обхваткой подходящего размера или двумя стеклянными палочками длиной 21 см, крепко связанными на концах (фиг. 48). Свободную часть листов бумаги отгибают на обратную сторону стекла. Листы бумаг должны быть шире пластинки, иначе при закреплении они могут собраться в складки, в результате неплотного прилегания нарушится равномерное поступление буферного раствора и процесс уравнивания будет проходить плохо.

Для уравнивания следует применять очень разбавленный буферный раствор, молярность которого на порядок ниже буферного раствора для хроматографии. Не рекомендуется применять буферный раствор с pH ниже 3, потому что при продолжительной хроматографии (16—24 ч) в таких условиях слой ионообменника

может адсорбировать ионы тяжелых металлов, и тогда уравнивание принесет больше вреда, чем пользы.

При уравнивании обычно применяют цитратный буферный раствор, имеющий концентрацию Na^+ 0,02 М и рН 3, используемый в 10-кратном разведении в качестве первого буферного раствора (А) в аминокислотном анализаторе. Во время уравнивания пластинки нижняя часть слоя (погружаемая в буферный раствор) может расслоиться, сползти с подложки или полностью отделиться от нее. Поэтому при уравнивании следует погружать конец пластинки не более чем на 1 см, а после высушивания целесообразно снимать с пластинки эту полоску слоя ионообменника.

Уравновешенные пластинки можно неограниченно долго хранить при комнатной температуре. Надо только следить за тем, чтобы они не адсорбировали пары аммиака. Чтобы исключить эту возможность, следует в частности запретить в лаборатории курение.

НАНЕСЕНИЕ ПРОБ

В классическом методе тонкослойной хроматографии перед нанесением на пластинку исследуемый материал необходимо обессолить. Обессоливание требует больших затрат труда и времени, а при малом количестве вещества приводит к значительным потерям. При ионообменной тонкослойной хроматографии соль, нанесенная вместе с образцом, не мешает процессу разделения, так как концентрация элюирующего буферного раствора, как правило, превышает концентрацию солей в образце. Чтобы получить полное разделение фракций, необходимо выполнять следующие требования:

1. рН исследуемого образца должен быть ниже 3, целесообразно доводить его до 2. Если образец находится в сухом виде (например, высушенный гидролизат или экстракт), то рекомендуется растворять его в 0,01 н. HCl .

2. Если исследуемый материал наносят в виде точки, ее диаметр не должен быть больше 2—3 мм, а если в виде полосы, то ширина ее не должна быть больше 1 см.

3. Образец наносят на пластинку с помощью тонкого капилляра. После каждого нанесения капли на пластинку место нанесения нужно подсушить, чтобы предотвратить повреждение слоя.

4. Чем выше концентрация наносимого образца, тем быстрее и удобнее проводить исследование. Максимально на пластинку следует наносить 1—2 мкг смеси аминокислот. При разделении смеси аминокислот с близкими значениями R_f для получения воспроизводимых результатов допустима 4—5-кратная разница в их концентрациях. Когда R_f аминокислот сильно различаются, это, конечно, не имеет значения.

5. Гидролизаты, если это необходимо (например, для определения Мет), можно непосредственно наносить на пластинку. В теплом потоке воздуха кислота мгновенно испаряется и Мет не успевает разложиться.

6. Щелочные гидролизаты, например при определении Три, наносят после нейтрализации или подкисления; образующаяся при этом соль не мешает хроматографии.

7. Если исследуемый материал растворяется в этаноле в присутствии кислоты, его суспендируют в растворе 0,1 н. HCl в 95%-ном этаноле, который осаждает следы белков, мешающих разделению. Для физиологических жидкостей (кровь, плазма и т. д.) такая обработка наносимого материала имеет большое значение.

8. Во всех до сих пор разработанных методиках ионообменной тонкослойной хроматографии ограничиваются одномерным разделением. Это одно из преимуществ данного метода по сравнению с классическими методами тонкослойной хроматографии. Для получения однозначной и простой для оценки картины следует в двух местах пластинки (в виде точки или полосы) нанести соответствующие контрольные смеси. Это очень облегчает идентификацию, а если по какой-то причине хроматографическая картина отличается от ожидаемой, тогда с помощью контрольной смеси можно выяснить причину неполного разделения и определить состав образца.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА НИНГИДРИНА

Для общего анализа аминокислот применяют 2 типа раствора нингидрина — кадмиевый и коллидиновый.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КАДМИЙ-НИНГИДРИНОВОГО РЕАГЕНТА

Раствор 1. 1 г нингидрина растворяют в 100 мл ацетона и раствор хранят в темной склянке на холоду.

Раствор 2. 1 г ацетата кадмия растворяют в смеси 50 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл дистиллированной воды.

ПРОЯВЛЕНИЕ

Для получения проявителя смешивают 100 мл раствора 1 и 20 мл раствора 2. Кадмий-нингидриновый реагент дает стабильную красную окраску со всеми аминокислотами (кроме Про, который в первые минуты проявления желтеет, а через несколько минут обесцвечивается). При одномерном разделении 16 аминокислот для достоверного отличия Гли от Ала, имеющих близкие значения R_f , целесообразно применять коллидиновый раствор нингидрина,

так как при этом разные аминокислоты окрашиваются в разный цвет; Асп, например, окрашивается в голубой цвет, Гли и Тир — в бурый, а большинство аминокислот — в пурпурный.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОЛЛИДИН-НИНГИДРИНОВОГО РЕАГЕНТА

Раствор 1. 1 г нингидрина растворяют в смеси 100 мл ацетона и 10 мл ледяной уксусной кислоты.

Раствор 2. 1 г ацетата кадмия растворяют в 100 мл 50%-ного раствора уксусной кислоты.

Раствор 3. Коллидин.

ПРОЯВЛЕНИЕ

Для получения проявителя смешивают 10 мл раствора 1, 1 мл раствора 2 и 1 мл раствора 3. Проявлять пластинки можно тремя способами.

1. При быстрой идентификации и качественной оценке хорошо высушенную в потоке теплого воздуха пластинку осторожно и равномерно опрыскивают выбранным нингидриновым реагентом. После опрыскивания слой высушивают феном. В течение 2—3 мин развивается окрашивание и проявляются пятна.

Примечание. Этот способ не применим для денситометрической полуколичественной или количественной оценки, так как в результате локальных перегревов некоторые участки на пластинке «перепроявляются». Если требуется полуколичественная или количественная оценка хроматограммы, надо выбрать один из двух следующих способов проявления:

2. Хроматограмму высушивают и опрыскивают, как описано в п. 1. После этого ацетон испаряют в потоке холодного воздуха, затем слой покрывают чистой и сухой стеклянной пластинкой и помещают в воздушный термостат при 45°C на 30 мин.

3. Когда проявляют при комнатной температуре, высушивание, проявление и испарение ацетона производят так же, как описано в п. 2. Накрытую стеклом хроматографическую пластинку оставляют на 8—16 ч в темном месте (в ящике или коробке). Чем ниже температура проявления, тем меньше окрасится фон; это имеет большое значение при количественном анализе, а также в тех случаях, когда количество исследуемого материала особенно мало (0,05—0,1 мкг).

Фон в первую очередь может окрашиваться в результате адсорбции паров аммиака, поэтому пластинки нельзя держать в атмосфере, загрязненной аммиаком и табачным дымом. Слой ионообменника занимает большую поверхность и может связывать аммиак даже из воздуха. Крайне важно для хроматографии применение свежеприготовленных растворов: при бактериальном проросте в

них может образоваться значительное количество аммиака, который загрязнит слой при уравнивании и последующем разделении.

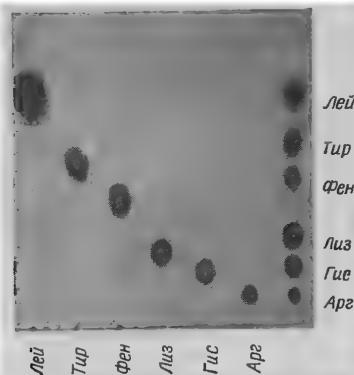
Хранение проявленных хроматограмм ничем не отличается от хранения обычных «классических» слоев (силикагель, целлюлоза). Готовую хроматограмму накрывают стеклянной пластинкой, обматывают обе пластинки склеивающей лентой и хранят несколько месяцев. С помощью копирующего аппарата хроматограммы можно непосредственно копировать для документации в размере оригинала.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

РАЗДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ И ОСНОВНЫХ АМИНОКИСЛОТ [3]

Ароматические и основные аминокислоты на пластинке «Фиксион 50 × 8» разделяются при одномерной хроматографии в цитратном буферном растворе pH 5,23 с концентрацией Na^+ 0,35 М (буферный раствор В, табл. 10), который используется в двух-колоночной системе аминокислотного анализатора. Типичная хроматография такого разделения представлена на фиг. 49. Колебания pH и концентрации буферного раствора не существенны для фракционирования. Хроматографию проводят при комнатной температуре без предварительного уравнивания. В камеру наливают слой буферного раствора высотой примерно 1 см. При хромато-

графии фронт буферного раствора должен подняться на высоту 15 см. Если пластинка не уравновешена, на это уходит около 2 ч. На уравновешенной пластинке (см. буферный раствор для уравнивания, табл. 10) это происходит за несколько минут. На примере разделения ароматических и основных аминокислот можно оценить высокую разрешающую способность ионообменной хроматографии в тонком слое по сравнению с соответствующей колоночной техникой. Известно, что на малой колонке в этом же буферном растворе (т. е. 0,35 М Na^+ , pH 5,23) ароматические аминокислоты не отделяются друг от друга.



Фиг. 49. Разделение основных и ароматических аминокислот на пластинке «Фиксион 50 × 8».

Таблица 10

Приготовление буферных растворов

	Буферный раствор для уравнивания	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж
pH	3,28	3,28	3,3	5,23	4,25	6,0	4,25	6,0
Концентрация Na ⁺ , М .	0,02	0,2	0,4	0,35	0,4	1,5	0,8	1,5
Концентрация цитрата, М	0,0067	0,067	0,4	0,177	0,067	0,03	0,067	0,03
Лимонная кислота × × H ₂ O, г	1,4	14,1	84,0	24,6	14,1	7,0	14,1	7,0
NaOH, г	0,8	8,0	16,0	14,0	8,0	4,0	8,0	4,0
NaCl, г	—	—	—	—	11,7	81,9	35,0	81,9
37%-ная HCl (уд. в. 1,19), мл	1,2	12,3	5,9	6,5	8,4	—	8,4	—
Глицерин, мл	—	100	—	—	—	—	—	—
Метилцеллозольв, мл .	—	—	—	—	—	100	—	—
Конечный объем, мл . .	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Хорошее разделение можно получить при хроматографии в летучем буферном растворе пиридин — уксусная кислота pH 5, который готовят на деионизованной воде, смешивая 40 мл уксусной кислоты и 40 мл пиридина и доводя конечный объем до 1000 мл. В этом буферном растворе в отличие от цитратного Тир и Фен меняются местами (фиг. 50), а аминокислоты в направлении от линии старта к фронту растворителя движутся в следующем порядке: Арг, Гис, Лиз, Тир, Фен.

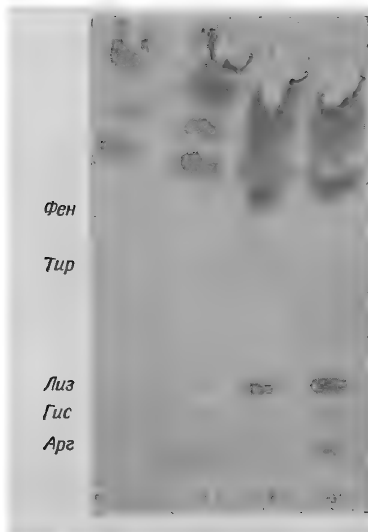
В исследованиях, проводимых в сельском хозяйстве и клинической практике, разделение основных и ароматических аминокислот имеет большое значение.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛИЗИНА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МАССОВЫХ АНАЛИЗОВ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Определение Лиз необходимо, например при селекции растений, при оценке кормов и т. п. Принцип работы с большим числом проб заключается в следующем [8].

Исследуемые образцы (например, зерна) гидролизуют в течение 40 ч при 105°C в атмосфере азота в 6 н. HCl. Из каждой пробы отбирают порции с одинаковым содержанием азота. Наш опыт показывает, что наилучшие результаты получаются с пробами, содержащими примерно 8—10 мг азота, однако это зависит также от сред-

него содержания Лиз (или другой аминокислоты; например Мет) в данной пробе. Эквивалентные по азоту порции из каждой пробы наносят непосредственно на пластинку в виде полосы. Если проба содержит, например, 8 мг азота, то при среднем содержании Лиз для удовлетворительной оценки пятен оптимально наносить в односантиметровую полосу 10 мкл раствора.



Фиг. 50. Определение лизина в гидролизатах растительных белков на пластинке «Фиксион 50×8».

После нанесения полос гидролизатов параллельно наносят контрольные смеси. Для лучшей идентификации целесообразно наносить на пластинку несколько проб с известным содержанием Лиз. Например, если среднее количество Лиз в 1-сантиметровой полосе 0,5 мкг (исходя из навески и количества нанесенного образца), следует наносить на пластинку 0,25, 0,5 и 0,75 мкг Лиз. При сравнении исследуемых образцов с контролем можно все образцы разделить на 3 типа, в которых содержание Лиз будет низким, средним и высоким. На основе этих данных отбирают те пробы, для которых можно провести количественный анализ. Поскольку содержание всех остальных аминокислот по сравнению с содержанием Лиз

1. овольно велико, рекомендуется хроматографировать пробы по крайней мере до тех пор, пока фронт буферного раствора не поднимется на высоту 17—18 см. Таким же способом можно определить в образцах содержание Мет. Типичная картина разделения показана на фиг. 50.

РАЗДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ И ОСНОВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

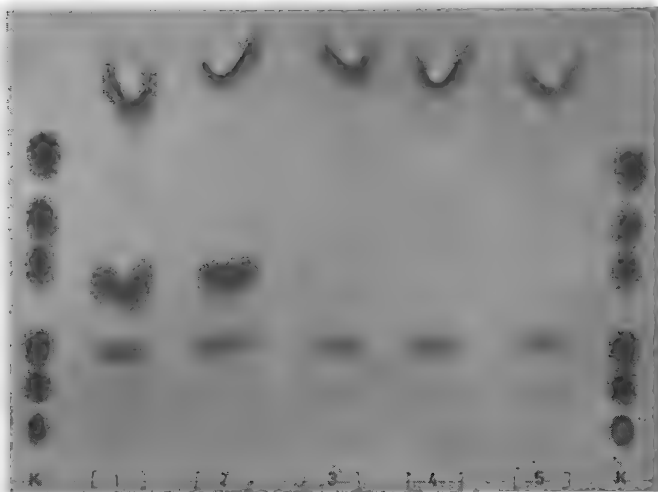
Метод применим для раннего выявления нарушений аминокислотного метаболизма у новорожденных. Эти наследственные дефекты обмена проявляются в накоплении в крови и моче определенных

аминокислот. Среди заболеваний, связанных с обменом аминокислот, самым распространенным является фенилкетонурия, при которой в крови накапливается Фен. Кроме того, известны заболевания, характеризующиеся накоплением Лиз, Гис, Тир, а также другими, менее специфическими нарушениями. Так, например, для цистинурии характерно не только повышение количества цистина, но и накопление гомоцистина.

Одно из достоинств тонкослойной ионообменной хроматографии состоит в том, что она является простым и доступным методом раннего обнаружения почти всех наследственных дефектов обмена аминокислот. Нами разработаны две методики для массовых испытаний.

ХРОМАТОГРАФИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ И ОСНОВНЫХ АМИНОКИСЛОТ ГЕПАРИНИЗИРОВАННОЙ КРОВИ [3]

50 мкл крови, взятой с гепарином, вносят в маленькую пробирку и добавляют $\frac{1}{3}$ объема трихлоруксусной кислоты (ТХУ). После



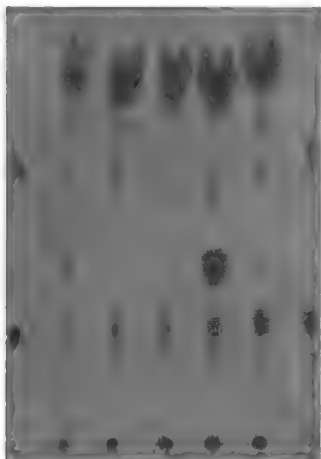
Фиг. 51. Хроматограмма надосадочной жидкости плазмы крови после обработки трихлоруксусной кислотой.

К — контрольная смесь аминокислот (с последовательно возрастающими R_f) Арг, Гис, Лиз, Фен, Тир, Лей. 1, 2 — пробы из плазмы больного фенилкетонурией; 3, 4, 5 — пробы из плазмы здорового человека.

центрифугирования 20 мкл надосадочной жидкости наносят на пластинку «Фиксион 50 × 8» и дважды хроматографируют вместе с контрольной смесью, нанесенной по обе стороны от опытной пробы. Для удаления ТХУ сначала хроматографируют в 0,01 н. HCl до тех пор, пока фронт буферного раствора не пройдет 18 см. На пластинке с сильным катионообменником ТХУ не связывается и движется вместе с фронтом растворителя, тогда как большинство аминокислот, в первую очередь ароматические и основные, связывается. Пластинку высушивают феном и затем подвергают хроматографии в буферном растворе цитрата натрия pH 5,23 (буфер В, табл. 10). Типичная хроматограмма представлена на фиг. 51.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПРОБЕ КРОВИ,
ВЫСУШЕННОЙ НА ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГЕ [7]**

Одну каплю крови (примерно 50 мкл) наносят на тонкую фильтровальную бумагу и дают ей высохнуть при комнатной температуре;



Фиг. 52. Исследование образцов крови, высушенных на фильтровальной бумаге, при диагностике фенилкетонурии.

К — контрольная смесь аминокислот Arg, His, Lys, Phe, Tyr, Leu. 1, 4 — кровь больного фенилкетонурией; 2, 3, 5 — кровь здорового человека.

диаметр пятна крови должен быть около 15 мм. С помощью пробойника вырезают из пятна 5—6 дисков диаметром около 5 мм и помещают их в вассермановскую пробирку, куда затем наливают 0,1 мл раствора 0,1 н. HCl в 95%-ном этаноле. Пробирки закрывают парафилом и оставляют на ночь при комнатной температуре. На следующий день образцы наносят на пластинки «Фиксион 50 × 8» по 10—15 мкл в одну точку. Благодаря присутствию в растворе спирта с помощью фена удается наносить образцы довольно быстро. После нанесения проводят хроматографию в цитратном (или каком-либо другом) буферном растворе pH 5,23. Типичная картина такого фракционирования показана на фиг. 52.

Этот способ очень удобен для анализа проб крови: кровь, взятую из пальца или из пятки, после непосредственного нанесения на фильтровальную

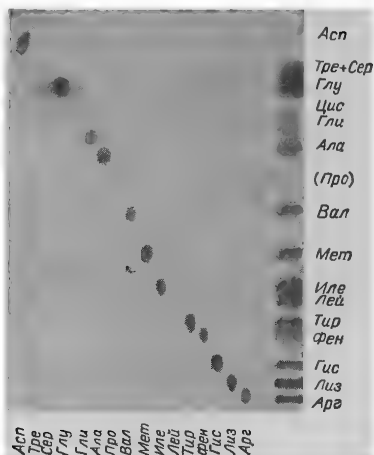
бумагу можно отправлять по почте. Кислотнospиртовое элюирование в данном случае позволяет обойтись без предварительного удаления белковых веществ, а также повторной хроматографии. При более низком значении рН и более высокой концентрации Na^+ основные компоненты разделяются на большее число фракций: Орн, например, можно отделить от Лиз [10]. Для этой цели применяют буферный раствор Г (табл. 10) с концентрацией Na^+ 0,4 М и рН 4,25.

ОДНОМЕРНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ [4]

С помощью тонкослойной ионообменной хроматографии можно разделить 16 аминокислот, присутствующих в белковом гидролизате, используя всего лишь один буферный раствор. В буферном растворе Б (табл. 10), имеющем относительно высокую концентрацию ионов цитрата, смесь из 16 аминокислот делится на 15 компонентов. Картина такого разделения показана на фиг. 53. Из 16 аминокислот не разделяются только Тре и Сер.

Около 0,5 мкг исследуемого и контрольного (смесь аминокислот или отдельные аминокислоты) материала наносят в виде точки на уравновешенную пластинку. Тщательно вымытую хроматографическую камеру заполняют буферным раствором до высоты 1 см, закрывают ее и помещают в воздушный термостат (45°C) на 15 мин. Нижний край пластинки погружают в подогретый буферный рас-

Фиг. 53. Разделение аминокислот на пластинке «Фиксиксон 50×8».



вор и проводят хроматографию, позволяя ему подниматься до высоты 18 см (около 3,5 ч). После высушивания хроматограмму проявляют коллидин-нингидриновым реагентом. Фракционирование очень чувствительно к колебаниям pH и температуры. Повышение pH на 0,1—0,2 единицы влечет за собой резкое увеличение R_f , что может улучшить разделение в нижней части хроматограммы — где мигрируют основные и ароматические аминокислоты (Лей, Иле, Мет и Вал), однако, разделение в верхней части хроматограммы — где мигрируют аминокислоты от Ала до Асп, ухудшается.

Одномерная тонкослойная ионообменная хроматограмма дает почти те же значения R_f аминокислот, что и диаграмма, полученная на аминокислотном анализаторе. Разделение аминокислот от Асп до Ала в анализаторе также чувствительно к изменению pH и молярности буферного раствора и ухудшается при увеличении pH. В то же время разделение аминокислот от Вал и далее уже нечувствительно к изменению pH и молярности.

Следовательно, если, например при хроматографии в тонком слое, основные и нейтральные аминокислоты до Вал имеют необычно высокие значения R_f и вместе с тем разделение в верхней части пластинки оказалось неполным, можно сделать вывод, что pH буферного раствора выше 3,3. К сожалению, большинство приборов для измерения pH недостаточно надежны и точны, поэтому приходится поступать так, как это принято при фракционировании в анализаторе, где pH буферного раствора проверяют по «месту цистина». В тонкослойной хроматографии pH также проверяют по относительной подвижности компонентов. В оптимальном варианте цистин располагается между Ала и Вал.

Если значение R_f Вал близко к 0,5, а Асп — к 0,9, но последняя еще не уходит с фронтом растворителя, то pH буфера оптимален. Колебания температуры в первую очередь отражаются на разделении Мет, Иле и Лей. При 45—50°C разделение этих трех аминокислот удовлетворительно и вполне воспроизводимо. При понижении температуры разделение ухудшается, а при температуре ниже 40°C аминокислоты вообще не разделяются. По-видимому, температура 45°C является оптимальной, так как, с одной стороны, достигается полное разделение этих трех аминокислот, а с другой — при такой температуре еще нет необходимости в добавлении специальных веществ (например, глицерина), уменьшающих испарение буфера, которые могут влиять на разделение в верхней части хроматограммы.

Следует подчеркнуть, что ионообменная хроматография в тонком слое не годится для количественного определения аминокислотного состава белковых гидролизатов, так как она дает только качественную картину. Зато этот метод вполне применим для исследования гидролизатов пептидов и пептидных остатков при расшифровке последовательности аминокислот. Он позволяет определить моляр-

ные пропорции обнаруженных аминокислот — обычно по отношению к какой-либо данной аминокислоте. Если, например, исследуют трипсиновый гидролизат, то таким эталоном для сравнения служит Лиз или Арг. Как правило, оценку производят визуально или на денситометре. Этим методом можно определить соотношение компонентов в пределах 4—5-кратных различий (например, молярные соотношения в пептиде Лиз₁Вал₂Глу₂Тре₃). При меньших различиях относительных молярных концентраций аминокислот метод теряет чувствительность. Это не позволяет его использовать для анализа белков, в которых эти различия могут быть очень малы (например, Лиз₁₀Асп₅₅Вал₄₈Глу₄₉ ... и т. д.).

ИОНООБМЕННАЯ ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ [11, 12]

Ферментативный гидролиз можно проводить различными способами, один из которых состоит в следующем: в пластмассовой пластинке толщиной 10—15 мм, длиной 10 см и шириной 5 см высверливается 2 ряда углублений. Объем всех, кроме одного, углублений должен быть примерно 50 мкл, а объем крайнего верхнего — в 3 раза больше. Это углубление выполняет роль реакционного сосуда; обозначим его через *P*, а все остальные цифрами 1, 2, 3...*n*. Исследуемый пептид (около 0,05 мкмоль) в 0,1 М бикарбонате аммония вносят пипеткой в углубление *P*. Во все остальные углубления наливают по 10 мкл 1 н. HCl. После этого в углубление *P* добавляют соответствующий фермент (например, карбоксипептидазу А, карбоксипептидазу В или их смесь, а в случае N-концевого анализа — аминопептидазу). Количество фермента составляет $\frac{1}{20}$ часть количества пептида. Сразу после добавления фермента 10 мкл смеси из «реакционного сосуда» переносят в углубление 1, где уже находится HCl.

Пластинку покрывают парафилом (или стеклянной пластинкой) и ставят в воздушный термостат при 37°C. Через определенные промежутки времени (целесообразно через 30, 60, 90, 120 мин) отбирают пробы из углубления *P* и переносят в углубления 2, 3, 4... и т. д. Таким образом можно проследить за кинетикой гидролиза, происходящего в углублении *P*. По окончании реакции содержимое углублений переносят на пластинку «Фиксион 50 × 8», на которую наносят также и контрольную смесь. Хроматографию проводят в буферном растворе pH 3,3 при 45°C. На проявленной пластинке фактически представлена кинетика гидролиза. Материал, взятый в начале гидролиза (нулевая точка — углубление 1), сравнивают с гидролизатами, взятыми через 30 (углубление 2), 60 (углубление 3), 90 (углубление 4) и 120 мин (углубление 5). Практически этим микрометодом за 2 ч можно достоверно определить порядок 3—5 аминокислотных остатков в 8—10-членном пептиде. Условия эксперимен-

та — соотношение фермента и субстрата, время инкубации, моменты отбора проб — можно варьировать в зависимости от природы субстрата, а также от цели анализа.

Количественные определения проводят способами, используемыми в обычной тонкослойной хроматографии. Хроматограммы на пластинках «Фиксион» денситометрируют точно так же, как и в случае других носителей (целлюлоза, силикагель). Если по какой-то причине (отсутствие приборов, нестабильность цветной реакции и т. п.) это неосуществимо, тогда соответствующие зоны можно элюировать. В связи с тем, что катионообменная смола обладает большой сорбцией, необходимо обращать внимание на то, чтобы элюирующий раствор имел рН 6 или выше. Если полуколичественные методы, применяемые в обычной тонкослойной хроматографии, дают неудовлетворительные результаты, нужно воспользоваться аналогичным количественным методом с использованием анализатора. Для определения полного аминокислотного состава целесообразно применять одноколоночный двухбуферный [1] или трехбуферный [2] метод (см. гл. VI).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕТИОНИНА И ЛИЗИНА В ОБРАЗЦАХ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ [8]

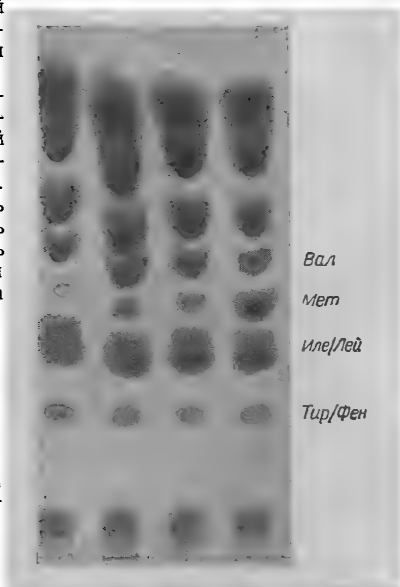
В работах по селекции растений и оценке кормов знание количества Лиз и Мет особенно важно. Совсем не обязательно при этом проводить количественный анализ огромного числа образцов. Предварительный отбор на основе приближенных данных дает вполне достаточную информацию о том, в каких именно образцах следует провести полный количественный анализ.

Для определения Мет в природных веществах можно использовать гидролизаты, полученные описанным выше методом. Они, как правило, содержат значительно большие количества Лиз, чем Мет. В связи с этим в образце с низким содержанием Мет довольно трудно на одной пластинке провести количественное определение этих двух аминокислот. Целесообразно проводить анализ Лиз и Мет в одном гидролизате на двух пластинках.

Гидролиз проводят по ранее описанному методу. Не удаляя кислоты, 20 мкл гидролизата в виде полосы шириной 1 см (если проба содержит 8 мг азота в 2 мл 6 н. HCl) наносят на уравновешенную пластинку «Фиксион 50 × 8» и подсушивают феном. Хроматографию проводят в буферном растворе А (табл. 10), который является первым буферным раствором анализатора, но дополнительно содержит 10% глицерина. Рекомендуются хроматографировать при 45°C и дать возможность фронту раствора подняться до верхнего края пластинки. Если содержание Мет в образце очень мало, то пластинку следует постепенно погружать в растворитель все глубже и проводить проточную хроматографию с помощью фильтровальной бумаги,

как это делается при уравнивании. При этом компоненты с высокими R_f элюируются с пластинки, что облегчает отделение Мет от Вал, Лей и Иле, которых, вероятно, значительно больше в смеси, чем Мет. Хроматограмму проявляют кадмий-нингидрином при 45°C или при комнатной температуре. Картина хроматографического разделения представлена на фиг. 54.

Для количественной оценки применяют любую из способов обычной тонкослойной хроматографии: денситометрию, элюирование и т. п. Если требуется определить содержание Лиз и Мет очень точно, можно использовать короткие экспресспрограммы аминокислотного анализатора [3] (см. гл. VI).



Фиг. 54. Определение метионина в гидролизатах растительных белков.

1 — низкое содержание Мет; 2, 3 — среднее содержание Мет; 4 — высокое содержание Мет.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПТОФАНА В ЩЕЛОЧНОМ ГИДРОЛИЗАТЕ [5]

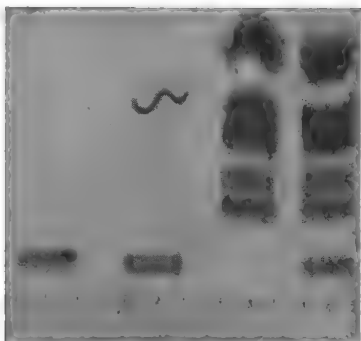
В кислотном гидролизате Три определить нельзя, так как при этом он полностью разлагается. В принципе существуют 2 методики определения Три: специфическая качественная цветная реакция в щелочном гидролизате и спектрофотометрия Три в исходном растворе. Обе методики имеют свои недостатки: цветная реакция в щелочном гидролизате не строго специфична, так как гидролизат содержит много примесей, а спектрофотометрический способ применим только тогда, когда вещество полностью растворяется, образуя прозрачный раствор, или смесь не содержит компонентов (например, коферментов), поглощающих при данной длине волны. Методы классической хроматографии в тонком слое или на бумаге не позволяют достоверно определить Три из-за высокой концентрации солей в

нейтрализованном гидролизате. При тонкослойной ионообменной хроматографии удается преодолеть это затруднение; так как высокое содержание соли не мешает разделению.

ГИДРОЛИЗ

Гидролиз проводят следующим образом: примерно 5 мг пептида или белка растворяют в ампуле в 2 мл 2 н. NaOH, заполняют ампулу азотом и запаивают ее. Гидролиз проводят в течение 5 ч при 105°C. После охлаждения добавляют 3 мл буферного раствора А и 1 мл концентрированной HCl.

ХРОМАТОГРАФИЯ



Фиг. 55. Определение триптофана на пластинке «Фиксигон 50 X 8».

1 — ацетилтриптофан; 2 — гидролизат глицилтриптофана; 3 — гидролизат пептида, не содержащего Три; 4 — гидролизат пептида, содержащего Три.

Для разделения используют буферный раствор Д (табл. 10), содержащий 10% метилцеллозоля (третий буферный раствор одноколоночной системы). Типичная хроматограмма показана на фиг. 55.

При относительно высоком pH [6] и концентрации Na^+ 1,5 М Три имеет самое низкое значение R_f . При хроматографии щелочного гидролизата пептидов для получения четкой картины достаточно продвижения фронта растворителя на высоту 8—10 см. Если требуется количественно определить Три, можно прибегнуть к ме-

тодике, разработанной для анализатора (экспресспрограмма):

Высота смолы в колонке	14 см
Буферный раствор	Д (табл. 10)
Скорость подачи буферного раствора	100 мл/ч
Скорость подачи нингидрина	50 мл/ч
Температура	55°C
Давление буферного раствора	8—12 атм

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЦЕМИЗАЦИИ В ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ [3]

Иногда в пептидном синтезе требуется провести количественную оценку рацемизации, происходящей по мере протекания реакции. Это имеет особое значение в многоступенчатых сложных синтезах, когда превращение определенных промежуточных продуктов является критическим этапом образования конечного продукта. Для обнаружения рацемизации японскими авторами была разработана остроумная методика, которую можно широко использовать на различных стадиях пептидного синтеза. Ее суть заключается в следующем. В соответствующих условиях реакции в процессе синтеза происходит взаимодействие дипептида Гли-L-Ала с L-Лей. В оптимальном варианте продуктом реакции является исключительно Гли-L-Ала-L-Лей. Если же происходит рацемизация, то наряду с этим продуктом в реакционной смеси появится трипептид Гли-D-Ала-L-Лей. Для обнаружения и определения содержания этих двух трипептидов японские авторы использовали аминокислотный анализатор. Правда, разработанная ими методика не подходит для анализа большого количества проб, так как с учетом времени регенерации на исследование одного образца требуется примерно 3,5 ч.

На пластинке «Фиксион 50×8» изомеры-трипептиды Гли-L-Ала-L-Лей и Гли-D-Ала-L-Лей разделяются довольно хорошо. По интенсивности пятен разделенных пептидов можно оценить степень рацемизации препарата. Хроматографию проводят на уравновешенных пластинках в буферном растворе Е (табл. 10), т. е. во втором буферном растворе одноколоночной системы анализатора. Для получения оптимального разделения на пластинку наносят 10 мкл раствора образца в 0,01 н. HCl (концентрация пептида 10 мг/мл). Хроматографируют при комнатной температуре до высоты 12—15 см. Если требуется количественно определить степень рацемизации (с точностью 5—10%), применяют денситометрию тонкослойных хроматограмм. Для получения более точных результатов целесообразно воспользоваться автоматическим анализатором.

**АНИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА ПЛАСТИНКЕ
«ФИКСИОН»**

В принципе в качестве тонкого слоя может быть использована любая ионообменная смола. В настоящее время уже началось опытное производство анионообменных пластинок со смолой, близкой по своим свойствам к смоле дауэкс 2 × 8. Как и для катионообменных пластинок, в данном случае используется сверхтонкая сферическая смола в ацетатной форме.

С точки зрения техники анионообменная хроматография отличается от катионообменной лишь выбором буферных растворов.

Уравновешивание анионообменных пластинок производят 0,01 М уксусной кислотой в тех же условиях, в которых уравновешивают катионообменные пластинки.

БЫСТРОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИСТЕИНА И ЦИСТИНА В ФОРМЕ ЦИСТЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОБРАЗЦАХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ [9]

С точки зрения питательной ценности кормов содержание цистина и Цис в веществах растительного происхождения имеет очень важное значение. Его можно определить прямым путем, но это требует огромных затрат труда, а полученные данные не позволяют рассчитать истинное содержание аминокислот, так как в условиях гидролиза они разлагаются. Обычно при количественном анализе цистина и Цис их предварительно окисляют надмуравьиной кислотой и затем определяют в смеси устойчивую цистеиновую кислоту.

Количество цистеиновой кислоты в кислотном гидролизате пропорционально сумме количеств цистина и Цис в исходном образце. Цистеиновая кислота на катионообменной колонке и пластинке движется впереди всех остальных компонентов, так как она не связывается смолой. Благодаря своему сильно кислому характеру она хорошо связывается с анионообменной смолой, в результате чего ее движение значительно задерживается и она отделяется от остальных кислых компонентов (Асп, Глу). Хроматографию цистеиновой кислоты проводят в буферном растворе пиридин—уксусная кислота рН 3,8. Чтобы его приготовить, смесь 10 мл пиридина и 100 мл уксусной кислоты разбавляют деионизованной водой до 1000 мл. Колебания рН буферного раствора под влиянием примесей не существенны для разделения. Поскольку гидролизованные образцы растворяют в 0,01 н. HCl, гидролизат можно фракционировать на катионообменной пластинке. На анионообменной пластинке адсорбция цистеиновой кислоты минимальна, поскольку она обладает самым низким значением R_f .

Анализ большого числа проб производится следующим образом.

ОКИСЛЕНИЕ НАДМУРАВЬИНОЙ КИСЛОТОЙ

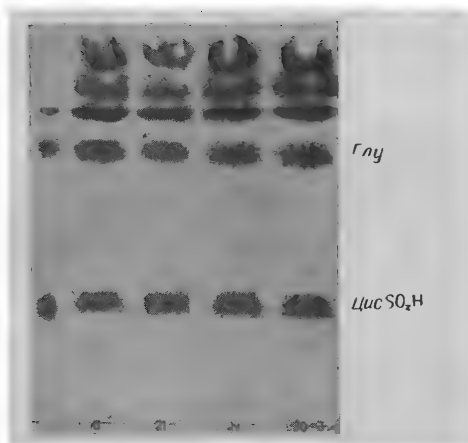
50 мг растертого образца (семена, корм и т. д.) смешивают с 2 мл надмуравьиной кислоты и оставляют при комнатной температуре на 2 ч. Для приготовления надмуравьиной кислоты смешивают 1 объем перекиси водорода и 9 объемов муравьиной кислоты и инкубируют 30 мин при 4°C; в реакции используют свежеприготовленный раствор.

ГИДРОЛИЗ

Окисленный образец гидролизуют в течение 48 ч в 5 мл 6 н. HCl при 105°C . После гидролиза кислоту удаляют над KOH и P_2O_5 .

ПОДГОТОВКА ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматография может быть выполнена двумя различными способами в зависимости от того, в каком источнике нужно определить цистеиновую кислоту: 1) в корме или 2) в определенном белке.



Фиг. 56. Определение цистеиновой кислоты в гидролизатах растительных белков на пластинке «Фикснор 50 X 8».

В случае 1) на пластинку наносят равные в расчете на сухой вес исходного образца порции гидролизатов. В случае 2) должно быть известно содержание азота в каждом образце и на основании этих данных наносят на пластинку порции гидролизатов, эквимольные по содержанию белка в исходных образцах. Например, если определяют содержание цистеиновой кислоты в образцах корма, целесообразно наносить гидролизаты полосками шириной в 1 см по 0,5 мг каждого образца в объеме 20 мкл. Если же определяют количество цистеиновой кислоты в образцах определенного белка, то гидролизаты разбавляют (после удаления кислоты) и из каждого наносят

на пластинку (полосками шириной в 1 см) порции, содержащие одинаковое количество азота (0,1 мг белка в 20 мкл раствора).

ХРОМАТОГРАФИЯ

Хроматографию проводят в буферном растворе пиридин—уксусная кислота. Проявление ничем не отличается от методики, описанной для катионообменной пластинки. Типичная хроматограмма представлена на фиг. 56.

Цитированная литература

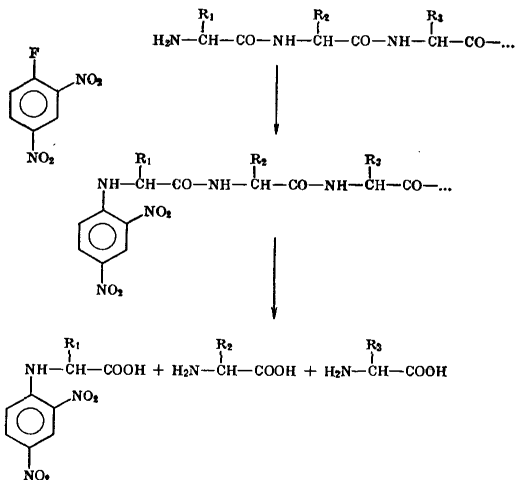
1. *Dévényi T.*, Single-column Procedure for the Automatic Analysis of Amino Acids, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **3**, 429—432 (1968).
2. *Dévényi T.*, Modified Single-column Procedure for the Automatic Analysis of Amino Acids, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **4**, 297 (1969).
3. *Dévényi T.*, Separation of Aromatic and Basic Amino Acids (Phenyl-ketonuri-test), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **5**, 435 (1970).
4. *Dévényi T.*, Amino Acid Analyser Programming for the Rapid Determination of Methionine and Lysine, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 129—132 (1971).
5. *Dévényi T.*, *Báti J.*, *Fábián F.*, Detection and Determination of Tryptophan, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 133 (1971).
6. *Dévényi T.*, *Hazai I.*, *Ferenczi S.*, *Báti J.*, One Dimensional Separation of Amino Acids, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 385 (1971).
7. *Dévényi T.*, *Báti I.*, *Kiss P.*, *Kovács J.*, Thin layer ion exchange chromatographic reining test for aminoacids in blood-samples dried on filter paper, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **7**, 237 (1972).
8. *Ferenczi S.*, *Dévényi T.*, Rapid estimation of cysteic acid, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 329 (1971).
9. *Ferenczi S.*, *Báti J.*, *Dévényi T.*, Testing of Methionine and Lysine in Plant Seeds, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 123 (1971).
10. *Hrabák A.*, *Ferenczi S.*, Determination of Ornithine in Biological Fluids, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 383 (1971).
11. *Kisfaludy L.*, *Löw M.*, *Dévényi T.*, Enzymatic Degradation of Peptides Containing Alfa-aminooxy-carboxylic Acids, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 393 (1971).
12. *Sajó M.*, *Dévényi T.*, Rapid Determination of C-terminal Sequences on the Nanomole Scale, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **7**, 233 (1972).

Глава XIII

АНАЛИЗ КОНЦЕВЫХ ГРУПП И СТУПЕНЧАТАЯ ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

А. ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВЫХ ГРУПП 2,4-ДИНИТРОФТОРБЕНЗОЛЬНЫМ МЕТОДОМ

После классической работы Сэнгера [17] 2,4-динитрофторбензольный метод стал одним из наиболее важных в белковой химии. Метод основан на следующих реакциях:



Реакции идут в слабощелочной среде: в присутствии NaHCO_3 2,4-динитрофторбензол (ДНФБ) связывается со свободными NH_2 -группами пептидной цепи. В результате гидролиза динитрофенилированного белка (ДНФ-белка) 20%-ной HCl , кроме свободных аминокислот, образуются ДНФ-аминокислоты, имеющие желтую окраску. ДНФ-аминокислоты, соответствующие N-концевому остатку белка (или пептида), имеют замену по α -углеродному атому.

Другие ДНФ-производные аминокислот (ϵ - NH_2 -ДНФ-Лиз, О-ДНФ-Тир) обычно являются производными не концевых аминокислот, а остатков, расположенных внутри цепи. Таким образом, количественно определяя и идентифицируя α -ДНФ-аминокислоты, мы получаем данные относительно N-концевых аминокислот, которые позволяют рассчитать число пептидных цепей у изучаемого белка.

ДНФБ — высокореакционноспособное соединение, количественно реагирующее с белками в мягких условиях без побочного расщепления пептидных связей. Поэтому можно не опасаться, что в ходе анализа в результате расщепления пептидных связей появятся «новые» концевые группы.

ДНФ-производные, за исключением некоторых, образующихся при реакции с остатками, расположенными внутри цепи, имеют желтую окраску, что облегчает их идентификацию и определение. Это чувствительные к свету соединения, поэтому эксперименты должны проводиться в темноте или по крайней мере следует избегать дневного освещения и использовать искусственное.

Анализ состоит из следующих стадий: 1) динитрофенилирование, 2) удаление избытка реагента, 3) гидролиз ДНФ-производного, 4) растворение ДНФ-аминокислот.

1. ДИНИТРОФЕНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Белок обрабатывается ДНФБ в слабощелочной среде при комнатной температуре.

МЕТОДИКА

1 г белка растворяют или суспендируют в 10 мл 10%-ного раствора NaHCO_3 и добавляют 2 объема 5%-ного раствора ДНФБ в этаноле. Реакционную смесь встряхивают в темноте при комнатной температуре в течение 4—72 ч. Продолжительность инкубации зависит от растворимости и реакционноспособности исследуемого белка. Если реакция идет в гетерогенной фазе, т. е. динитрофенилируют малорастворимое вещество, то лучше увеличить время инкубации и сравнить результаты, получаемые при динитрофенилировании в течение 24, 48 и 72 ч. Однако если реакция идет в гомогенной фазе, т. е. динитрофенилируют растворимый в бикарбонате белок или белок не выпадает в осадок после добавления спиртового раствора ДНФБ (или образуется лишь небольшой осадок), то реакция заканчивается за 2—4 ч. По окончании реакции раствор или суспензию подкисляют несколькими каплями 0,6 н. HCl . Осадок отделяют центрифугированием и промывают сначала смесью этанол—эфир (1 : 1) и затем эфиром. ДНФ-белок хранят в темном месте в вакуумном эксикаторе.

2. ГИДРОЛИЗ ДНФ-БЕЛКА ИЛИ ДНФ-ПЕПТИДА И ЭКСТРАКЦИЯ ДНФ-ПРОИЗВОДНЫХ

ДНФ-производное гидролизуют кислотой. Обычно в условиях эксперимента большая часть ДНФ-аминокислот не разрушается и их можно экстрагировать органическими растворителями в соответствии с растворимостью.

МЕТОДИКА

ДНФ-производное гидролизуют в 80-кратном избытке 6 н. HCl при 100° С 16 ч в ампуле, запаянной под вакуумом или в атмосфере азота. Гидролизат разбавляют в 3 раза дистиллированной водой и трижды экстрагируют свободным от перекиси эфиром. Эфирные фракции собирают и встряхивают 2—3 раза с дистиллированной водой для удаления следов кислоты, обезвоживают добавлением сухого Na₂SO₄, упаривают, а затем растворяют в нескольких каплях метанола и в 5—10 мл воды. Водную фазу освобождают от кислоты в вакууме и снова упаривают. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока полностью не удалят HCl. В заключение остаток растворяют в небольшом объеме воды.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. В описанных условиях ДНФ-Про разрушается полностью, а ДНФ-Гли — на 60—70%. ДНФ-Про еще можно определить, если вести гидролиз в 12 н. HCl в течение 4 ч. Для определения ДНФ-Гли гидролиз следует проводить в течение 3—4 ч в 6 н. HCl или же в смеси хлорной и уксусной кислот.

2. Описанная выше методика рекомендуется и для гидролиза ДНФ-пептидов.

3. Если в ходе анализа получается отрицательный результат, т. е. концевые группы обнаружить не удастся, должны быть рассмотрены следующие возможные причины этого: 1) исследуемое вещество представляет собой циклическую молекулу и не имеет свободной α -NH₂-группы; 2) молекула имеет малореакционноспособный (заблокированный) N-конец; 3) концевая группа ацетилирована (как, например, в цитохроме с или в белке вируса табачной мозаики); 4) и наконец, возможно, что ДНФ-производное (ДНФ-Про, ДНФ-Гли) разрушилось в ходе определения. Необходимо также учитывать, что выход ДНФ-Вал и ДНФ-Иле невелик из-за устойчивости к гидролизу пептидных связей Вал-X и Иле-X; в таких случаях следует проводить гидролиз в течение 72 ч.

4. Если концевым остатком является бис-ДНФ-Гис, то более удобно экстрагировать гидролизат этилацетатом, так как бис-ДНФ-Гис плохо растворим в эфире.

5. В эфире растворимы почти все концевые ДНФ-производные, а ε -NH₂-ДНФ-Лиз, N-ДНФ-Гис, ДНФ-цистеиновая кислота (концевая) и α -ДНФ-Арг (концевой) растворяются также в воде.

3. ХРОМАТОГРАФИЯ ДНФ-АМИНОКИСЛОТ НА БУМАГЕ

ДНФ-аминокислоты идентифицируют с помощью одно- или двумерной хроматографии на бумаге и определяют их количество соответствующими методами [11].

МЕТОДИКА

А. Метод Леви с использованием толуола. Очистка толуола. Перегнанный толуол 24 ч перемешивают с серной кислотой (1 : 1). Органическую фазу декантируют и отгоняют над AlCl₃. Перегнанный толуол встряхивают несколько раз с 20%-ным раствором Na₂CO₃ для удаления кислоты, затем обезвоживают с CaCl₂ и повторно перегоняют.

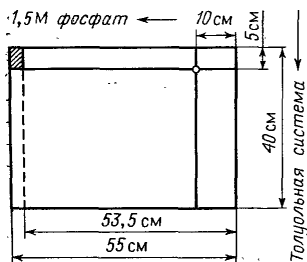
Подготовка стеклянной камеры для хроматографии на бумаге. Хроматографию проводят в темноте при постоянной температуре в стеклянном цилиндре высотой 46 см и диаметром 23 см, на дно которого помещают один в другой два кристаллизатора диаметром 15 и 19 см.

Размер листа фильтровальной бумаги. Размер и форма листа фильтровальной бумаги, так же как и место нанесения образца при двумерной хроматографии на бумаге, показаны на фиг. 57.

Приготовление фосфатного буферного раствора. Для хроматографии необходим 1,5 М фосфатный буферный раствор pH 6, который готовят следующим образом: 138 г NaH₂PO₄ · H₂O и 71 г Na₂HPO₄ растворяют в теплой воде и доводят объем до 1 л.

Приготовление толуольной системы. 60 мл толуола, 18 мл пиридина, 36 мл этиленхлоргидрина и 36 мл 0,8 М аммиака тщательно взбалтывают в делительной воронке и оставляют на несколько часов. Нижнюю водную фазу отбрасывают, а органическую фазу фильтруют через бумагу для удаления капель воды.

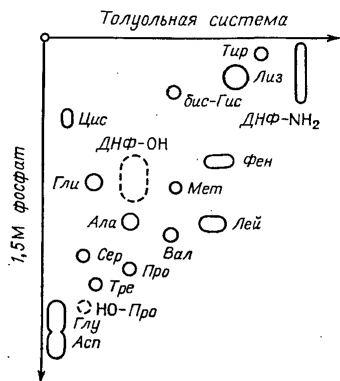
Хроматография. После нанесения образца бумагу сворачивают в цилиндр и помещают между двумя кристаллизаторами в органическую фазу смеси растворителей через 6 ч после того, как органи-



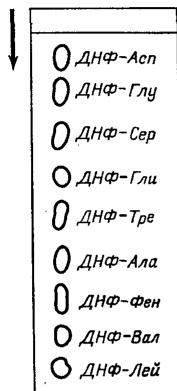
Фиг. 57. Размеры листа фильтровальной бумаги для хроматографии ДНФ-аминокислот [11].

ческая фаза была налита во внешнее пространство, а 200 мл 0,8 М аммиака — во внутреннее. Восходящая хроматография длится 15 ч, после чего хроматограмму высушивают при 40—50° С. Затем проводят нисходящую хроматографию в другом направлении в уже упомянутом фосфатном буферном растворе.

Распределение ДНФ-аминокислот при двумерной хроматографии показано на фиг. 58. При анализе сложных смесей неизвестного



Фиг. 58. Двумерная хроматография ДНФ-аминокислот [11].



Фиг. 59. Хроматография ДНФ-аминокислот в цитратном буферном растворе.

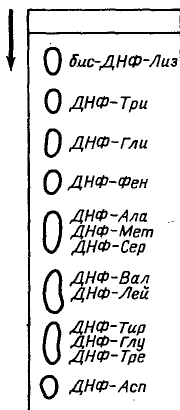
состава идентификацию проводят с помощью одновременно приготовленных одномерных контрольных хроматограмм.

Б. Цитратный метод Ровери [15]. Большая часть ДНФ-аминокислот может быть разделена в 1 М цитратном буферном растворе рН 6,4 (фиг. 59). Метод особенно удобен для количественных определений в случае не очень сложных смесей, например смеси нескольких ДНФ-аминокислот и ДНФ.

В. Система третичный амиловый спирт — фталат [1].

1) Приготовление фталатного буферного раствора. 22,45 г бифталата калия суспендируют в 220 мл воды, который растворяется в этом объеме при добавлении 4 г NaOH, перемешивании и слабом нагревании. Если это необходимо, раствор фильтруют и затем разводят в 10 раз водой. Проверяют рН раствора и, если он не равен 6,0, доводят его до этого значения разбавленными растворами NaOH или уксусной кислоты. Отклонения рН на 0,1—0,2 единицы не существенны для хроматографии.

При использовании фталатного буферного раствора pH 5 разделение ДНФ-аминокислот значительно отличается от фракционирования в буферном растворе pH 6. При pH 5 хорошо разделяются ДНФ-Асп и ДНФ-Глу, тогда как в других условиях они движутся вместе.



Фиг. 60. Хроматография ДНФ-аминокислот в системе третичный амиловый спирт—фталат.

Приготовление фталатного буферного раствора pH 5. 50 мл 0,1 М раствора бифталата калия смешивают с 23,9 мл 0,1 н. NaOH и смесь разводят до 100 мл дистиллированной водой.

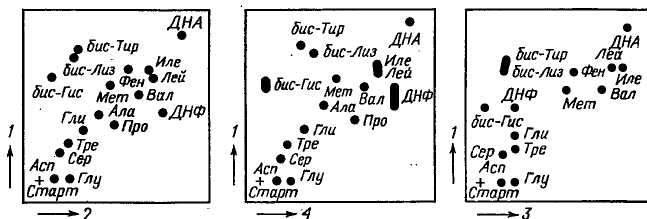
2) *Приготовление смеси растворителей.* В делительную воронку на 1 л наливают 300 мл третичного амилового спирта и 300 мл фталатного буфера. Смесь тщательно встряхивают и оставляют отстаиваться несколько часов. Затем фазы отделяют друг от друга, органическую фазу фильтруют через бумагу и наливают в хроматографическую камеру.

3) *Приготовление фильтровальной бумаги.* Фильтровальную бумагу предварительно увлажняют фталатным буферным раствором и высушивают несколько дней на воздухе. Наилучшие результаты получают на бумаге Шляйхер-Шуль 2043 б.

Разделение ДНФ-аминокислот в системе третичный амиловый спирт—фталат показано на фиг. 60.

4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНФ-АМИНОКИСЛОТ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Тонкослойная хроматография успешно применяется для идентификации ДНФ-аминокислот. По сравнению с хроматографией на бумаге этот метод более чувствителен и требует меньших затрат времени. Чаще всего смеси разделяют в силикагеле в следующих системах растворителей [2]: а) толуол—пиридин—этиленхлоргидрин—аммиак (0,8 М) (100 : 30 : 60 : 60); эта система гетерогенна, верхняя фаза используется для хроматографии, нижняя — для уравнивания адсорбента; б) хлороформ—бензиловый спирт—уксусная кислота (70 : 30 : 3); в) бензол—пиридин—уксусная кислота (80 : 20 : 2); г) хлороформ—метанол—уксусная кислота (95 : 5 : 1). Для идентификации достаточно примерно 0,2—0,5 мкг ДНФ-аминокислоты. Распределение ДНФ-аминокислот при двумерной хроматографии в различных системах растворителей показано на фиг. 61.



Фиг. 61. Идентификация ДНФ-аминокислот тонкослойной хроматографией на силикагеле.

Раствор 1: толуол — пиридин — этиленхлоргидрин — 0,8 М аммиак (100 : 30 : 60 : 60). Раствор 2: хлороформ — бензиловый спирт — уксусная кислота (70 : 30 : 3). Раствор 3: бензол — пиридин — уксусная кислота (80 : 20 : 2). Раствор 4: хлороформ — метанол — уксусная кислота (95 : 5 : 1). ДНА — динитроанилин, ДНФ — динитрофенол.

5. НЕПРЯМАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНФ-АМИНОКИСЛОТ

ДНФ-аминокислоты разрушают в реакции аммонолиза и полученные свободные аминокислоты идентифицируют хроматографией на бумаге [12].

МЕТОДИКА

Фракцию, содержащую ДНФ-производное в метаноле или этилацетате, высушивают, суспендируют в небольшом объеме воды и опять высушивают для удаления следов органического растворителя. Затем остаток растворяют примерно в 50-кратном избытке концентрированного раствора аммиака и переносят в толстостенную ампулу, которую запаивают и выдерживают при 105°C в течение 4—8 ч. Содержимое пробирки высушивают в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 и КОН, растворяют в нескольких каплях воды и хроматографируют на бумаге Шляйхер-Шуль 2043 b в бутанольной системе в направлении сверху вниз.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. В бутанольной системе большинство окрашенных в желтый цвет продуктов деградации, образуемых при аммонолизе, мигрируют с фронтом растворителя, и поэтому необходимо, чтобы растворитель дошел до конца листа.

2. ДНФ-производные аминокислот, содержащих серу и оксигруппу, частично разрушаются. В процессе аммонолиза разрушаются и некоторые другие аминокислоты, поэтому инкубация с аммиаком должна быть по возможности непродолжительной. Время, необходимое для этой реакции, подбирают, анализируя небольшие

аликвоты образцов. Как правило, через 4 ч большая часть ДНФ-производных превращается в свободные аминокислоты.

3. Аммонолиз нельзя применять для количественных определений, но это очень хороший и быстрый метод качественного анализа.

6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНФ-ПРОИЗВОДНЫХ

ДНФ-фракцию, полученную из смесей с известным количеством белка или пептида, хроматографируют вместе с определенным количеством контрольных ДНФ-аминокислот, после чего ДНФ-аминокислоты элюируют из бумаги и определяют их содержание фотометрически по калибровочной кривой, построенной для ДНФ-аминокислот. Таким способом можно определить концевые группы белков и пептидов, число полипептидных цепей белков, минимальный молекулярный вес белков и аминокислотный состав белковых гидролизатов.

МЕТОДИКА

А. Определенное количество контрольного ДНФ-производного гидролизуют в 6 н. HCl в тех же условиях, в которых проводили гидролиз ДНФ-белка или ДНФ-пептида. Гидролизат экстрагируют эфиром, органическую фазу упаривают и растворяют в небольшом измеренном количестве метанола. Аликвоты такого контрольного раствора наносят на бумагу.

Б. Известное количество изучаемой ДНФ-фракции хроматографируют на бумаге в условиях, необходимых для данного ДНФ-производного. Пробы контрольного препарата, содержащие различное количество вещества, хроматографируют на том же листе бумаги. По окончании хроматографии пятна ДНФ-аминокислот вырезают вместе с контрольными, бумагу измельчают на мелкие кусочки и помещают в пробирки. В каждую пробирку наливают по 5 мл 1 %-ного раствора NaHCO_3 и в течение 30 мин при периодическом встряхивании в темноте производят элюирование проб. Экстинкцию растворов при 360 нм измеряют в спектрофотометре. Содержание ДНФ-аминокислот в исследуемой фракции определяют по калибровочной кривой, построенной для контрольных образцов.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Использование контрольных проб, обработанных так же, как изучаемые образцы, устраняет ошибки, связанные с разрушением в ходе гидролиза. Поскольку содержание ДНФ-производных определяют по калибровочным кривым, построенным для контрольных образцов, с которыми проводились точно те же операции, что и с исследуемыми образцами, ошибки за счет неконтролируемых

факторов метода (разрушение под действием света, потери в ходе приготовления и экстракции и др.) компенсируются.

2. ДНФ-Про фотометрируют при 385 нм, а ДНФ-пептиды — при 350 нм.

3. Если пользуются ранее построенными калибровочными кривыми, с помощью поправочных коэффициентов их следует привести к условиям данного эксперимента.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДНФ-АМИНОКИСЛОТ

При встряхивании смеси ДНФБ и аминокислот в спиртовом щелочном растворе образуются ДНФ-производные аминокислот.

МЕТОДИКА

10 ммоль аминокислоты растворяют или суспендируют в 40 мл воды и добавляют 2 г безводного Na_2CO_3 . Раствор нагревают до 40°C и добавляют 10 ммоль ДНФБ. Реакция заканчивается за 30—50 мин, на что указывает полное растворение компонентов реакционной смеси. Смесь подкисляют, добавляя несколько капель концентрированной HCl . ДНФ-аминокислоты перекристаллизовывают из соответствующих растворителей (табл. 11).

Таблица 11

Растворители для перекристаллизации ДНФ-аминокислот

ДНФ-аминокислота	Растворитель
Ала, Цис, (Цис) ₂ , Фен, Глу, Мет, Лей, норВал, оксиПро, Про, Тре, Вал	Эфир—петролейный эфир
Асп, Гли, Глу, Сер	Метанол—вода
Арг, Гис	Ацетон—вода
Лиз, Тир, Три	Ацетон—эфир
β -Ала	Этанол—вода

ПРИМЕЧАНИЯ

Некоторые аминокислоты при подкислении отделяются в виде маслообразного материала, который осаждается ацетоном. Полученную суспензию разводят ацетоном, обезвоживают безводным Na_2SO_4 , отфильтровывают, большую часть ацетона упаривают, а ДНФ-аминокислоту осаждают бензолом и петролейным эфиром. Если материал еще имеет маслянистую консистенцию, всю процедуру повторяют. Осадок ДНФ-аминокислот перекристаллизовывают из соответствующего растворителя.

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ϵ -ДНФ-ЛИЗИНА

α -NH₂-группу блокируют ионами Cu²⁺ и ϵ -NH₂-группу динитрофенилируют в слабощелочной среде. После удаления ионов Cu²⁺ выделяют ϵ -N-ДНФ-производное [14].

МЕТОДИКА

0,5 г лизина растворяют в 10 мл дистиллированной воды, раствор доводят до кипения и добавляют к нему небольшими порциями SiCO₃. Избыток SiCO₃ удаляют фильтрованием, а к раствору добавляют 1,5 г NaHCO₃ и 1,5 г ДНФБ, растворенного в 20 мл этанола. Смесь встряхивают при комнатной температуре 2 ч и фильтруют. Осадок промывают дистиллированной водой, этанолом и наконец эфиром, а затем суспендируют в 5 мл дистиллированной воды, подкисляют несколькими каплями 1 н. HCl и сосуд с прозрачным раствором помещают в измельченный лед. Через охлажденный раствор пропускают сероводород для удаления ионов Cu²⁺. Осадок CuS удаляют фильтрованием после адсорбции его активированным углем. Прозрачный фильтрат высушивают в вакууме и ДНФ-производное перекристаллизовывают из 6 н. HCl.

ПРИМЕЧАНИЯ

δ -N-ДНФ-производное орнитина можно получить аналогичным образом. α -N-ДНФ-Гис очень быстро образуется при добавлении небольшого количества ДНФБ, а динитрофенилирование ацетильного производного дает N-ДНФ-Гис.

Б. ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ ДАНСИЛЬНЫМ МЕТОДОМ [7,8]

Аминогруппы белков и пептидов реагируют с флуоресцентным красителем диметиламинонафталинсульфонилхлоридом (сокращенно дансилхлорид) в щелочной среде. Как и при динитрофенилировании, связь аминокислоты с реагентом не разрушается при гидролизе, и поэтому ДНС-аминокислоты можно идентифицировать в гидролизатах дансильрованного белка (ДНС-белок) или пептида. Такие гидролизаты содержат α -ДНС-аминокислоты, образовавшиеся из N-концевых аминокислот, и ϵ -ДНС-Лиз и O-ДНС-Тир, образовавшиеся из остатков Лиз и Тир, расположенных внутри цепи. Кроме того, дансилхлорид, реагируя с аммиаком, присутствующим в растворе, дает ДНС-сульфонамид (ДНС-NH₂), а в результате гидролиза сульфонилхлоридной группы образуется ДНС-сульфоновая кислота (ДНС-ОН).

Одно из преимуществ дансирования по сравнению с динитрофенилированием состоит в том, что после кислотного гидролиза ДНС-белка аминокислоты могут быть идентифицированы электрофоретически или хроматографически сразу после расщепления белка без экстракции гидролизата. Другим преимуществом является очень высокая чувствительность. Максимум возбуждения флуоресценции ДНС-аминокислот находится около 550 нм, их флуоресценция настолько интенсивна, что с помощью электрофореза на бумаге легко можно определить 1—5, а с помощью тонкослойной хроматографии 0,2—1,0 нмоль ДНС-производного.

МЕТОДИКА

ТЕХНИКА ДАНСИЛИРОВАНИЯ [9]

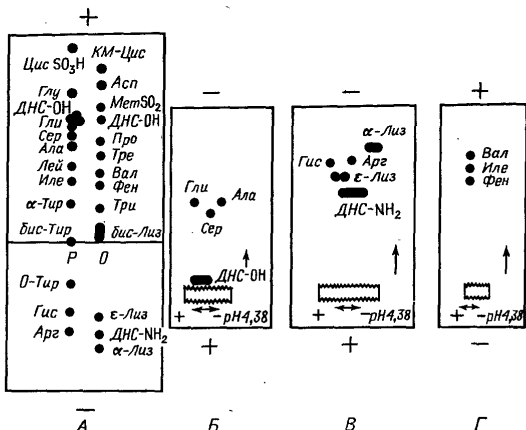
В маленькую пробирку с внутренним диаметром около 3—4 мм и длиной 25—30 мм вносят в зависимости от метода идентификации от 0,3 до 5,0 нмоль препарата. Объем раствора измеряют калиброванным капилляром. Чтобы избежать больших потерь при малом объеме проб (5—20 мкл), следует переместить капли исследуемого материала со стенок на дно пробирки с помощью непродолжительного центрифугирования при 2000—3000 об/мин. Затем раствор пептида высушивают в вакуумном эксикаторе, высушенный образец растворяют в 10 мкл 0,2 М NaHCO_3 при осторожном встряхивании и вновь высушивают в вакууме. Цель высушивания в данном случае состоит в удалении аммиака, который мешает реакции. К сухому остатку добавляют 10 мкл деионизованной воды (свободной от аммиака), растворяют при осторожном встряхивании и затем добавляют 10 мкл раствора, содержащего 2 мг/мл ДНС-Cl-реактанта в ацетоне. Смесь осторожно встряхивают, пробирку закрывают парафильмом и помещают в термостат при 37°C. О завершении реакции можно узнать по исчезновению желтой окраски — обычно это происходит через полчаса. После этого реакционную смесь высушивают, добавляют 30 мкл 6 н. HCl , пробирку запаивают и препарат гидролизуют 10—18 ч при 105°C. После гидролиза пробу центрифугируют для того, чтобы капли раствора со стенок попали на дно, затем пробирку осторожно открывают и высушивают в вакууме над NaOH и P_2O_5 .

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНС-АМИНОКИСЛОТ

ДНС-аминокислоты могут быть идентифицированы с помощью электрофореза на бумаге или в тонком слое, а также с помощью тонкослойной хроматографии.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНС-АМИНОКИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА НА БУМАГЕ

Для идентификации ДНС-аминокислот необходимо провести электрофорез несколько раз. Сначала его осуществляют в пиридин-ацетатном буферном растворе pH 4,38 (фиг. 62). В данном случае важно, чтобы pH был именно 4,38, так как отклонение от этого значения даже на 0,02 единицы заметно влияет на качество разделения.



Фиг. 62. Идентификация ДНС-аминокислот хроматографией на бумаге.

А. Электрофорез при pH 4,38. Б, В, Г. Электрофорез при pH 1,9.

Буферный раствор состоит из 32 мл уксусной кислоты, 18 мл пиридина и 1950 мл дистиллированной воды. Стартовая точка находится на расстоянии одной трети длины листа от катода. Гидролизат наносят на сухую бумагу, причем стартовое пятно должно быть как можно меньше. Электрофорез продолжается 110 мин при градиенте напряжения 80 В/см. Если нет высоковольтной аппаратуры, то можно работать при среднем напряжении, пропорционально увеличив продолжительность электрофореза. Аппарат с непосредственным жидкостным охлаждением нельзя применять для первого электрофореза, поскольку ДНС-производные Про, Вал, Иле, Лей, Фен и Тир могут быть экстрагированы органическими растворителями.

Отдельно готовят два контрольных раствора ДНС-аминокислот. Один из растворов (0) содержит ДНС-КМ-Цис, ДНС-Асп, ДНС-МетSO₂, ДНС-Про, ДНС-Тре, ДНС-Вал, ДНС-Фен, ДНС-Три,

бис-ДНС-Лиз, α -ДНС-Лиз, ε -ДНС-Лиз, ДНС-NH₂. Другой раствор (Р) содержит ДНС-Цис-SO₃H, ДНС-Глу, ДНС-Гли, ДНС-Сер, ДНС-Ала, ДНС-Лей, ДНС-Иле, α -ДНС-Тир, ДНС-Гис, ДНС-Арг, О-ДНС-Тир, бис-ДНС-Тир. Из этих растворов, в которых концентрация каждого производного равна 5 мкмоль/мл, для нанесения отбирают по 1 мкл.

После электрофореза бумагу следует тщательно высушить в сушильном шкафу при 100°C. Даже небольшое количество влаги или пиридина может вызвать сильное тушение флуоресценции, что заметно снижает чувствительность метода. Рекомендуется также установить за ультрафиолетовой лампой фен и обдувать теплым воздухом бумагу в ходе определения.

Иногда разделение ДНС-Гли, ДНС-Ала и ДНС-Сер происходит неудовлетворительно. То же относится и к группе производных ДНС-Иле, ДНС-Вал и ДНС-Фен, а в присутствии сильного пятна ДНС-NH₂ также и к группе ДНС-Гис, ДНС-Арг, α -ДНС-Лиз и ε -ДНС-Лиз.

Идентификацию ДНС-Гли, ДНС-Сер и ДНС-Ала может осложнить сопутствующее пятно ДНС-ОН, однако все эти четыре компонента хорошо разделяются электрофоретически при pH 1,9. Участок электрофореграммы, содержащий эти четыре компонента (фиг. 62, Б), вырезают, пришивают к другому листу фильтровальной бумаги и проводят электрофорез при pH 1,9. На фиг. 62, Б показано распределение производных, полученное в этих условиях. Зоны, содержащие основные ДНС-производные (фиг. 62, В) и ДНС-Вал, ДНС-Иле, ДНС-Фен (фиг. 62, Г), анализируют таким же образом.

Если на N-конце белка или пептида находятся Вал или Иле, картина может осложниться из-за появления флуоресцирующих пептидов ДНС-Вал-Х и ДНС-Иле-Х благодаря устойчивости к гидролизу пептидных связей Вал-Х и Иле-Х. Подвижность этих производных отличается от подвижности ДНС-Вал и ДНС-Иле, и в результате может возникнуть ложное представление о гетерогенности исследуемого пептидного препарата. В таких случаях рекомендуется увеличить продолжительность гидролиза.

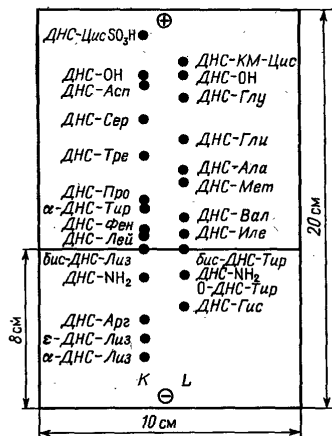
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНС-АМИНОКИСЛОТ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ В ТОНКОМ СЛОЕ [16]

ДНС-аминокислоты быстро и надежно могут быть идентифицированы с помощью электрофореза в тонком слое. В настоящее время в продаже имеются готовые для употребления тонкослойные пластинки для электрофореза (например, MN-полиграм, Sil N-HR, фирма Macherey-Nagel Co, ФРГ).

На пластинку размером 20 × 10 см в место старта, отмеченное на расстоянии 8 см от катода, наносят гидролизат ДНС-пептида

при постоянном подсушивании. Контрольные аминокислотные смеси имеют следующий состав. Раствор К: ДНС-Цис SO_3H , ДНС-Асп, ДНС-Сер, ДНС-Тре, ДНС-Про, α -ДНС-Тир, ДНС-Фен, бис-ДНС-Лиз, ДНС-Арг, ДНС-Лей, ϵ -ДНС-Лиз, α -ДНС-Лиз. Раствор Л: ДНС-КМ-Цис, ДНС-Глу, ДНС-Гли, ДНС-Ала, ДНС-Мет, ДНС-Вал, бис-ДНС-Тир, О-ДНС-Тир, ДНС-Иле, ДНС-Гис.

Буферный раствор в конечном объеме 1 л содержит 12 мл уксусной кислоты и 8 мл пиридина (рН 4,5). Увлажнение пластинки про-



Фиг. 63. Идентификация ДНС-аминокислот тонкослойным электрофорезом при рН 4,5 в смеси пиридин—уксусная кислота.

водят следующим образом: буферный раствор наливают в стеклянную камеру или фотографическую кювету и осторожно погружают в него пластинку. Когда уровень раствора достигнет стартовой линии, пластинку вынимают и после удаления избытка раствора промоканием вновь погружают в раствор другой стороной. Сама стартовая линия смачивается только тогда, когда оба фронта жидкости сходятся друг с другом; таким образом избегают прямого увлажнения стартовой линии.

Электрофорез проводят в горизонтальном аппарате при градиенте напряжения 80 В/см. Сила тока при ширине пластинки 10 см должна быть 50—60 мА. После 20—25 мин электрофореза пластинку вынимают, высушивают струей теплого воздуха и проводят идентификацию

ДНС-аминокислот в ультрафиолете.

Электрофореграмма показана на фиг. 63. Разделение Фен, Иле и Лей может представить известные трудности, так же как идентификация основных ДНС-аминокислот и разделение бис-ДНС-Лиз и бис-ДНС-Тир. Для разделения Фен, Иле и Лей нужно на другой пластинке сначала провести электрофорез, а затем хроматографию в перпендикулярном направлении в системе бензол—пиридин—уксусная кислота (80 : 20 : 2). Такой процедурой ДНС-Фен идентифицируется с полной определенностью, а ДНС-Иле и ДНС-Лей разделяются очень четко. ДНС-Гис определяют с помощью реакции Паули сразу же после электрофореза; таким способом его дифференцируют от других производных основных аминокислот: ДНС-Лиз и ДНС-Арг.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНС-АМИНОКИСЛОТ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА ПОЛИАМИДНЫХ ПЛАСТИНКАХ [18]**

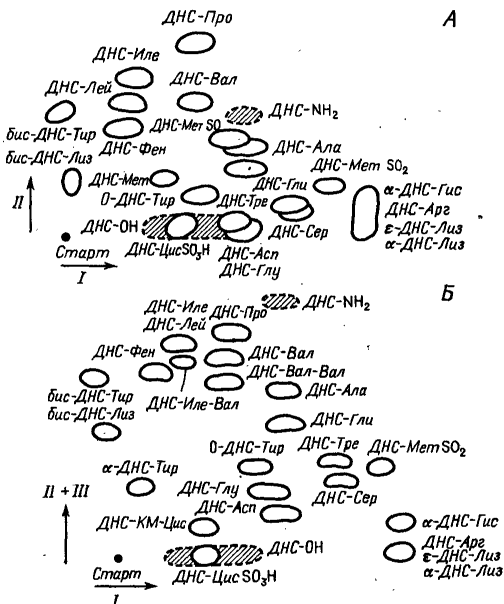
Все ДНС-аминокислоты могут быть определены с большой степенью достоверности тонкослойной хроматографией на полиамидных пластинках. Идентификация обеспечивается тем, что полиамидные пластинки устроены по принципу «сэндвича», т. е. обе стороны поддерживающей пластинки покрыты тонким слоем полиамида. На одной стороне пластинки хроматографируют изучаемую ДНС-аминокислоту, а на другую наносят контрольную смесь аминокислот. Пользуясь прозрачностью пластинки, после хроматографии можно определить неизвестную ДНС-аминокислоту.

Последовательность операций в данном методе следующая. В одном из углов пластинки на расстоянии 1 см от краев отмечают стартовую точку. Необходимо проследить за тем, чтобы эта точка была в одном и том же месте с обеих сторон. Затем гидролизат, приготовленный описанным выше способом, растворяют в 20 мкл 50%-ного пиридина и половину его наносят на одну, а половину — на другую сторону, все время подсушивая раствор; важно наносить материал действительно в виде точки. Затем на одну сторону пластинки наносят контрольную смесь аминокислот, состоящую из следующих компонентов: ДНС-Сер, ДНС-Глу, ДНС-Про, ДНС-Гли, ДНС-Иле, бис-ДНС-Тир, ДНС-Арг. В контрольной смеси, 1 мкл которой наносят в место старта, концентрация каждого производного равна 1 нмоль/мкл.

Обычно для идентификации аминокислот необходимо провести хроматографию в трех системах растворителей: I — 1,5%-ная муравьиная кислота; II — бензол—уксусная кислота (9 : 1); III — этилацетат—метанол—уксусная кислота (10 : 1 : 1). В некоторых случаях при идентификации ϵ -ДНС-Лиз, α -ДНС-Гис и ДНС-Арг может оказаться необходимой четвертая система: IV — 0,05 М Na_3PO_4 — этанол (3 : 1). Для идентификации ДНС-цистеиновой кислоты требуется пятая система растворителей: V — 1 М NH_4OH — этанол (1 : 1).

Исследуемые образцы сначала в течение 30 мин хроматографируют в растворе I, а затем, после высушивания пластинки феном, в течение 60 мин в перпендикулярном направлении в системе II. Пластинку опять высушивают и проверяют разделение компонентов в ультрафиолете. Хроматографию в системе III (в том же направлении, что и в системе II) проводят лишь тогда, когда необходимо идентифицировать ДНС-Тре и ДНС-Сер или ДНС-Асп и ДНС-Глу. В этом случае хроматография продолжается 45 мин. Если в смеси присутствует ДНС-Цис SO_3H , то после хроматографии в системе II пробы хроматографируют в течение 40 мин в том же направлении в системе V. Для разделения ϵ - NH_2 -ДНС-Лиз, α - NH_2 -ДНС-Гис и ДНС-Арг после хроматографии смеси в системе II ее хроматографируют в течение 45 мин в системе IV.

Распределение пятен на хроматограмме показано на фиг. 64. Полиамидные пластинки можно применять несколько раз, если их тщательно отмывать после каждого опыта следующим образом: пластинку погружают в 50%-ный ацетон, содержащий 1 М NH_4OH , стараясь не касаться стенок сосуда, и отмывают 2 ч, постоянно перемешивая отмывающий раствор. После высушивания пластинки



Фиг. 64. Идентификация ДНС-аминокислот хроматографией в тонком полиамидном слое.

Растворители: I — 1,5%-ная муравьиная кислота, II — бензол — уксусная кислота (9:1), III — этилацетат — метанол — уксусная кислота (10:1:1, по объему). Сокращения: КМ-Цис — 8-карбоксиметилцистеин; Цис SO₃H — цистеиновая кислота, Мет SO — метионинсульфоксид, Мет SO₂ — метионинсульфон.

можно использовать вновь, при этом лучше придерживаться одного и того же направления тока растворителей.

ДНС-Арг определяют в реакции Сакагуши. Бис-ДНС-Лиз и бис-ДНС-Тир можно разделить хроматографией во втором направлении в системе 2-бутанон—пропионовая кислота—вода (15:5:6).

ДНС-производное N-концевого Три полностью разрушается в ходе гидролиза. Поэтому полностью отрицательный результат в опытах по дансильрованию аминокислот может свидетельствовать о том, что на N-конце присутствует Три. ДНС-Три можно легко определить после гидролиза химотрипсином. Все три производных Тир (*бис*-ДНС-Тир, *О*-ДНС-Тир и α -ДНС-Тир) обычно определяют без труда, однако из-за плохой растворимости в воде *бис*-производное часто не обнаруживается, хотя известно, что оно присутствует в смеси. В таких случаях гидролизат растворяют в пиридине и переносят на бумагу или тонкослойную пластинку. Для ДНС-КМ-Цис характерны особенно большие потери в ходе гидролиза, поэтому следует брать для анализа больше материала, если предполагается, что эта аминокислота должна находиться на конце пептида.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДНС-АМИНОКИСЛОТ

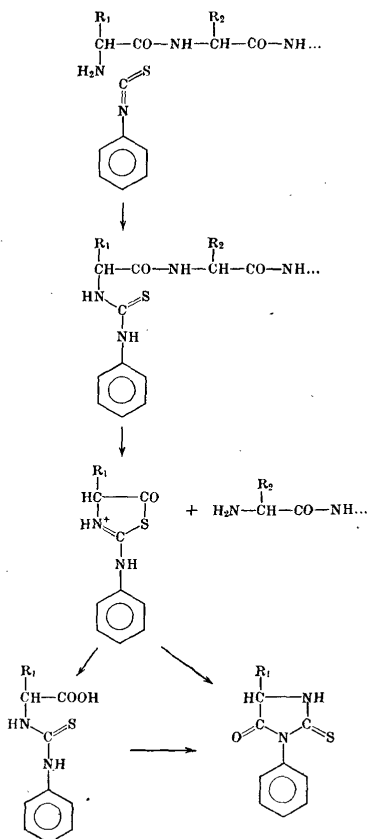
ДНС-аминокислоты, необходимые для контрольных растворов, не обязательно выделять во всех случаях в чистом кристаллическом виде. Вполне достаточно дансильровать раствор аминокислот, как это описано ниже, без выделения их из раствора. Такие побочные продукты, как ДНС-ОН и ДНС-NH₂, не мешают идентификации, и поэтому их можно не удалять из смеси.

Метод выделения, описанный ниже для ДНС-Ала, можно использовать также для получения следующих гомогенных кристаллических производных: ДНС-Гли, ДНС-Вал, ДНС-Лей, ДНС-Иле, ДНС-Фен, ДНС-Сер, ДНС-Тре, ДНС-Про, ДНС-Мет, ДНС-Мет SO₂, ДНС-Цис, ДНС-Асп и ДНС-Глу.

150 мг аланина растворяют в 5 мл 1 М бикарбоната натрия. К этому раствору при сильном перемешивании добавляют 100 мг ДНС-Cl, растворенного в 5 мл ацетона. Если часть ДНС-Cl выпадает в осадок, его растворяют, добавив 0,2 мл триметиламина. После 10 мин перемешивания реакционную смесь экстрагируют бутилацетатом (3 раза по 7 мл) для удаления ацетона, ДНС-NH₂ и непрореагировавшего ДНС-Cl. pH водной фазы доводят 2 н. HCl до 3,4 и ДНС-Ала экстрагируют бензолом (3 раза по 5 мл). К бензольному экстракту осторожно добавляют по каплям пиперидин до помутнения и оставляют на холоду. Перекристаллизацию проводят из бутилацетата.

В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВОЙ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В РЕАКЦИИ С ФЕНИЛИЗОТИОЦИАНАТОМ

Деградация с помощью фенилизотиоцианата (ФТИЦ) была предложена Эдманом [4, 5]. Основные стадии реакции с ФТИЦ представлены на схеме (стр. 282); ФТИЦ, взаимодействуя со свободными



аминогруппами, образует фенилтиокарбамильное производное (ФТК-производное). Это соединение в кислой среде циклизуется с последующим отщеплением фенилтиогидантоинового производного (ФТГ-производного) N-концевой аминокислоты. Оставшаяся часть белка (или пептида) представляет собой исходное вещество, но уже без концевой остатка.

Поскольку остаток обладает новым N-концом, то, очевидно, он опять будет реагировать с ФТЦ. В результате на следующем этапе

реакции второй остаток пептидной цепи так же образует ФТК-производное и может быть идентифицирован.

Многократное повторение реакции Эдмана, таким образом, позволяет определить N-концевую аминокислотную последовательность изучаемого пептида. Этот метод имеет исключительно большое значение при определении последовательности пептидов, изолированных из ферментативных гидролизатов, и, следовательно, при выяснении первичной структуры белков с высоким молекулярным весом.

Деградация с помощью ФТЦ проводится в несколько стадий: 1) добавление ФТЦ, 2) циклизация ФТК-производного, 3) экстрагирование свободного ФТГ-производного, 4) идентификация и определение ФТГ-производного или анализ укороченного пептида, 5) повторная деградация, идентификация и т. д. Из-за различной растворимости белков и пептидов приходится проводить реакцию Эдмана с ними в разных экспериментальных условиях.

ФТГ-производные могут быть идентифицированы прямым или косвенным путем. Прямая идентификация достигается хроматографией ФТГ-фракций. При косвенной идентификации ФТГ-производные сначала разрушают добавлением $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или 6 н. HCl , а затем определяют полученные свободные аминокислоты. Косвенный метод непригоден для количественного анализа, так как при такой обработке происходит сильное разрушение веществ.

При изучении небольших пептидов подходящим методом аминокислотного анализа, например с помощью автоматического аминокислотного анализатора, можно достаточно определенно установить состав пептида, лишённого своей концевой группы. Проследив за изменением аминокислотного состава на последовательных этапах деградации, можно восстановить аминокислотную последовательность изучаемого пептида.

Деградацию по Эдману можно комбинировать с дансильным методом. При этом после отщепления концевого остатка определяют N-конец оставшегося пептида и воспроизводят последовательность, основываясь на данных N-концевого анализа.

Г. ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ФТЦ

Белок, растворенный в гуанидинхлориде, реагирует с ФТЦ и в кислой среде происходит циклизация и отщепление N-концевой аминокислоты, которую можно экстрагировать, а затем определить как ФТГ-производное.

МЕТОДИКА

100 мг белка растворяют или суспендируют в 5 мл дистиллированной воды, добавляют равный объем диоксана и в автотитраторе доводят рН до 8,7—8,8 0,1 М NaOH . К раствору (или суспензии),

постоянно перемешивая его, при комнатной температуре добавляют 0,5 мл ФТЦ; при этом следят за тем, чтобы рН смеси оставался постоянным.

После образования ФТК-белка (около 2 ч) смесь экстрагируют сначала циклогексаном, затем бензолом и в заключение высушивают. Сухой препарат, освобожденный от бензола, растворяют в 3 мл раствора гуанидинхлорида (1 г/мл) и экстрагируют эфиром несколько раз до тех пор, пока экстинкция экстракта при 270 нм не станет практически равна нулю. Затем к раствору белка в гуанидинхлориде добавляют 1 мл 6 н. HCl и за процессом циклизации наблюдают в спектрофотометре. ФТГ-производное экстрагируют эфиром, свободным от перекисей (лучше всего это делать в аппарате Сокслета).

Эфирный экстракт содержит ФТГ-производное N-концевой аминокислоты. Пептид, находящийся в водной фазе с гуанидинхлоридом после добавления диоксана и ФТЦ может быть снова подвергнут деградации.

ПРИМЕЧАНИЯ

Недостаток реакции деградации с ФТЦ заключается в том, что её продукт — ФТК-производное — плохо растворим в воде. Применение гуанидинхлорида лишь частично снимает это затруднение — в данных условиях выход все равно невелик, что может быть причиной плохой воспроизводимости. Для преодоления этих трудностей были предложены две модификации метода: с использованием полосок фильтровальной бумаги [6] или с использованием целлюлозного порошка [3]. Однако ни одна из них существенно не улучшает метода.

Д. АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ В ПЕПТИДАХ МЕТОДОМ ЭДМАНА В ДАНСИЛЬНОМ ВАРИАНТЕ [7—9]

После удаления N-концевой аминокислоты пептида, анализируемого по методу Эдмана, N-конец оставшейся полипептидной цепи можно определить дансильным методом. На следующем этапе отщепляют новую концевую аминокислоту и снова определяют N-конец остатка. Благодаря очень высокой чувствительности дансильного метода при наличии 0,1 мкмоль пептида можно с достаточной достоверностью идентифицировать 10—15 аминокислот.

Раствор, содержащий необходимое для анализа количество пептида, наливают в ампулу со шлифом и высушивают. Затем материал растворяют в 0,15 мл воды и добавляют 0,15 мл пиридина, содержащего 5% ФТЦ. Через гетерогенную реакционную смесь пропускают струю азота, затем ампулу запаивают и помещают в термостат

на 60 мин при 40° С. После инкубации смесь высушивают в предварительно нагретом до 60°С вакуумном эксикаторе над NaOH и P₂O₅, помещая эксикатор после откачивания воздуха в термостат при 60°С. После высушивания к остатку добавляют 0,2 мл безводной трифторуксусной кислоты и помещают пробирку на 30 мин в термостат при 45°С. Затем смесь высушивают в вакууме, сухой остаток суспендируют в 0,2 мл дистиллированной воды (образуется мутная суспензия) и экстрагируют бутилацетатом 3 раза по 1,5 мл. Водную фазу высушивают в предварительно нагретом эксикаторе, и сухой остаток вновь растворяют в 0,15 мл воды. Раствор содержит укороченный пептид; из него отбирают пробу для анализа концевой аминокислоты и после этого определения вновь проводят деградацию.

Точно придерживаясь рекомендуемой продолжительности обработки и используя предварительно нагретый эксикатор, можно закончить одну ступень деградации, включая определение концевой группы, за один рабочий день.

При работе методом Эдмана очень важно тщательно высушивать препарат, а также полностью удалять трифторуксусную кислоту, поскольку следы кислоты мешают нейтрализовать раствор и обеспечить оптимальную величину pH. Это ведет к мгновенному гидролизу ДНС-Cl, который не успевает прореагировать с α-NH₂-группами. Если после гидролиза выявляется лишь ДНС-ОН, то дансирование следует повторить, особенно внимательно контролировать pH. На закисление среды указывает выделение пузырьков газа; если оно происходит, следует сразу же проверить pH и в случае необходимости нейтрализовать раствор, добавив бикарбонат.

Применяя дансил-эдмановскую методику, нужно соблюдать особые предосторожности при исследовании пептидов, в которых два остатка Асп следуют друг за другом. Поскольку Асп не всегда отщепляется количественно, можно ошибочно идентифицировать последовательность Асп-Асп. Иногда Гли освобождается вместе с предшествующим аминокислотным остатком, и это может привести к тому, что Гли останется незамеченным в ходе анализа.

Е. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ В ПЕПТИДАХ ДЕГРАДАЦИЕЙ ПО ЭДМАНУ И КОЛИЧЕСТВЕННЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ АНАЛИЗОМ

При ступенчатой деградации пептидов для расшифровки последовательности достаточно определить аминокислотный состав пептида, остающегося после каждого очередного отщепления. Предположим, пептид имеет состав А, В, С, D, Е. Если мы после каждой ступени ФТЦ-деградации проведем определение состава укороченного пептида, то получим следующие результаты:

после деградации I: A, C, D, E;	потерян остаток B;
после деградации II: A, D, E;	потерян остаток C;
после деградации III: D, E;	потерян остаток A;
после деградации IV: E;	потерян остаток D.

Из полученных данных очевидно, что пептид имеет последовательность В-С-А-Д-Е.

Однако этот метод целесообразно использовать лишь тогда, когда аминокислотный анализ можно провести достаточно точно и быстро.

1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФТГ-ПРОИЗВОДНЫХ

ФТГ-производные идентифицируют и определяют хроматографией на бумаге либо непосредственно, либо после их разрушения.

ПРЯМАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Фильтровальную бумагу Ватман 1 смачивают крахмальным раствором и высушивают на воздухе. Для хроматографии используют три смеси растворителей: гептан—пиридин (7 : 3); гептан—бутанол—муравьиная кислота (4 : 4 : 2); гептан—бутанол—муравьиная кислота (4 : 2 : 4), верхняя фаза.

Восходящая хроматография длится 5—8 ч. Пятна проявляют, опрыскивая бумагу свежеприготовленным иодазидным реактивом: ФТГ-производные дают белые пятна на коричневом фоне.

Примечания. Пятна, получаемые при хроматографии, не имеют четких границ, для них характерны большие «хвосты», образующиеся в результате адсорбции. Проявление пятен не совсем удовлетворительное: специфичность его недостаточна, к тому же пятна быстро исчезают и поэтому промежуток времени, когда можно оценить хроматограмму, очень невелик. Бледные пятна не имеют четких границ.

НЕПРЯМАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ [6]

ФТГ-производные разрушают в 6 н. HCl при 150°C (16 ч). Нейтрализованные препараты хроматографируют в бутанольной системе так же, как и свободные аминокислоты.

Примечание. ФТГ-производные Сер, Тре, Цис и Про разрушаются полностью; из ФТГ-Три образуется Гли.

2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФТГ-АМИНОКИСЛОТ

0,3 ммоль аминокислоты и такое же количество Na_2CO_3 растворяют в 3 мл дистиллированной воды и добавляют 3 мл диоксана, очищенного от перекисей. Затем к смеси приливают 0,1 мл ФТЦ

и инкубируют при комнатной температуре 2,5—3 ч. После инкубации для удаления избытка ФТЦ смесь экстрагируют несколько раз сначала циклогексаном, а затем бензолом. Следы бензола удаляют продуванием воздуха, после чего к раствору добавляют HCl до концентрации 1 М, необходимой для циклизации. Смесь перемешивается при комнатной температуре 3—4 ч, и большинство ФТГ-производных начинает кристаллизоваться. Если кристаллизация не начинается, раствор медленно концентрируют, высушивая под вакуумом. Перекристаллизацию ведут из соответствующего растворителя (табл. 12).

Таблица 12

**Растворители, используемые для перекристаллизации
фенилтиогидантоиновых производных**

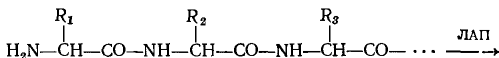
ФТГ-аминокислота	Растворитель
Ала, Фен, Гли, Мет, Про, Тир, Три, Вал	Уксусная кислота — вода
Асп, Лиз (ϵ -NH ₂), Глу, амиды	Этанол — вода
Гис, Иле, Лей	Этанол
Тре	Вода

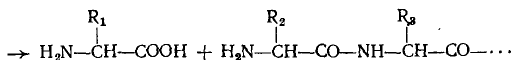
ПРИМЕЧАНИЯ

Циклизация является критическим этапом реакции назависимо от того, идет ли реакция с аминокислотой, с пептидом или с белком. Спектры поглощения ФТК-производного и циклизованного ФТГ-производного имеют различные максимумы: 270 и 240 нм соответственно. Поэтому за процессом циклизации можно следить спектрофотометрически при 240 нм: реакция заканчивается, когда перестает изменяться экстинкция при этой длине волны. Если циклизация идет слишком медленно, процесс можно ускорить, увеличив концентрацию кислоты или осторожно нагревая смесь. Однако нужно помнить, что существуют устойчивые пептидные связи, циклизация которых идет очень медленно или не идет вообще.

Ж. ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ

Под действием лейцинаминопептидазы (ЛАП) отщепляется N-концевой аминокислотный остаток белка или пептида. Место атаки фермента показано на следующей схеме:





МЕТОДИКА

1. *Выделение лейцинаминопептидазы.* Фермент выделяют модифицированным методом Хилла и др. [10] из свежих почек свиньи.

а) *Приготовление ацетонного порошка.* 3 кг свежих почек свиньи измельчают мясорубкой и гомогенизируют в 1,5 л дистиллированной воды, которую добавляют порциями (6 раз). Гомогенат охлаждают до 4°C, после чего приливают 4500 мл 53%-ного холодного этанола и оставляют стоять 1 ч. К смеси добавляют 1800 мл 95%-ного этанола, содержащего 180 мл хлороформа, и вновь оставляют стоять 30 мин. После этого гомогенат фильтруют на холоду через бумагу, что занимает несколько часов.

На следующий день к осадку добавляют 2 объема холодного ацетона и смесь фильтруют на бюхнеровской воронке. Осадок вновь суспендируют в 2 объемах ацетона и фильтруют, как и раньше, на холоду. Затем осадок суспендируют в 0,25 объемах смеси ацетон—эфир (1 : 1), фильтруют и промывают на воронке 0,25 объемами эфира. Последнему как можно быстрее дают возможность испариться при комнатной температуре и материал высушивают окончательно, помещая его в вакуумный эксикатор на несколько часов. Таким способом из 3 кг почек получают около 450 г порошкообразного материала.

б) *Фракционирование сульфатом аммония.* 600—800 г ацетонового порошка гомогенизируют в 10 объемах дистиллированной воды 1 мин при комнатной температуре; далее, однако, все операции проводят при 4°C.

Гомогенат центрифугируют, надосадочную жидкость охлаждают и плотный осадок экстрагируют, повторно гомогенизируя его в 1 объеме холодной дистиллированной воды. Экстракты объединяют и разведенным раствором NaOH доводят pH до 8. Затем к раствору добавляют мелко измельченный порошок сульфата аммония до 0,4 насыщения, после чего добавляют суперсель Хифло (Huflo Supercel) и через 30 мин суспензию фильтруют через бумагу. Неактивный осадок отбрасывают, а к фильтрату добавляют сульфат аммония до 0,8 насыщения. После нового добавления суперселя Хифло осадок собирают на бюхнеровской воронке и суспендируют в 500 мл раствора сульфата аммония (0,5 насыщения). После перемешивания в течение нескольких минут суспензию центрифугируют, осадок отбрасывают, а к супернатанту добавляют сухой сульфат аммония до 0,7 насыщения. Суспензию оставляют стоять 30 мин, осадок отделяют центрифугированием, а супернатант диализуют

против 0,005 М трис-НСl рН 8 для удаления сульфата аммония.

в) *Фракционирование $MgCl_2$* . После диализа раствор осторожно нейтрализуют разведенной HCl, стараясь не доводить рН ниже 7, поскольку фермент очень лабилен в слабокислой среде. К раствору добавляют $MgCl_2$ до концентрации 0,01 М и оставляют стоять на холоду 2 ч. Суспензию центрифугируют, рН надосадочной жидкости доводят до 8 и добавляют к нему равный объем 0,05 М трис-НСl рН 8.

г) *Тепловая денатурация*. Полученный таким образом раствор быстро нагревают до 70°C в водяной бане при температуре 85°C и через 4 мин охлаждают до 20°C в ледяной бане. Неактивный осадок удаляют фильтрованием.

д) *Фракционирование ацетоном*. Фильтрат после нагревания нейтрализуют разбавленной HCl и охлаждают до 0°C. Затем добавляют охлажденный до —60°C сухим льдом ацетон до конечной концентрации 25%. Температура раствора при этом не должна подниматься выше —4°C. Осадок центрифугируют на холоду, растворяют в небольшом объеме 0,005 М трис-НСl рН 8 и диализуют против того же буферного раствора.

е) Далее фермент очищают электрофорезом на бумаге или в крахмальном геле.

2. *Определение ферментативной активности. Методика*. Перед определением фермент активируют в смеси, содержащей 0,2 мл 0,025 М $MnCl_2$, 0,5 мл триса и 1 мл исследуемого раствора ЛАП (конечный объем 2,5 мл). Смесь инкубируют при 40°C 30 мин. В другой пробирке смешивают 0,2 мл 0,025 М $MnCl_2$, 0,5 мл триса, 1 мл 0,125 М L-лейцинамида и 0,55 мл воды. К этому раствору добавляют 0,25 мл раствора активированного фермента, а затем через определенные интервалы времени начиная с 0 мин отбирают аликвоты по 0,2 мл и титруют. При титровании в каждую пробирку вносят 3 капли тимолфталейна. Как только появляется голубая окраска, добавляют 1,8 мл этанола и титруют до появления постоянной синей окраски.

Расчет. Для того чтобы определить удельную активность фермента, сначала рассчитывают константу k_1 реакции по формуле

$$k_1 = \frac{1}{t} \lg \frac{100}{100 - H},$$

где t — время в минутах, H — процент гидролиза, рассчитанный из уравнения

$$H = \frac{(V_t - V_0) \cdot 100}{V_s/2},$$

где V_t — количество щелочи, израсходованное за время t ; V_0 — количество щелочи, израсходованное при $t = 0$; V_s — количество щелочи, израсходованное на 1 мл биодата. Удельную активность

выражают в виде протеолитического коэффициента $C_1 = \frac{k_1}{E}$, где E — концентрация фермента в мг/мл. После фракционирования ацетоном величина C_1 равна примерно 25 — 55.

3. *Дегградация белка.* а) ЛАП активируют, как описано выше. б) К активированному ферменту добавляют примерно 50-кратный избыток диизопропилфторфосфата (ДИПФФ), растворенного в 0,1 М изопропанолe, и белок-субстрат, растворенный в 0,05 М трис-HCl pH 8, до конечной концентрации 1%.

в) Через соответствующие интервалы (0,30, 60, 120 мин и т. д.) отбирают аликвоты и депротеинизируют их добавлением 10 объемов ацетона. Надосадочную жидкость концентрируют и идентифицируют хроматографией в бутанольной системе.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-КОНЦОВ ГИДРАЗИНОЛИЗОМ

Белки и пептиды при нагревании с безводным гидразином подвергаются гидразинолизу. При такой обработке расщепляются все пептидные связи, и все аминокислоты, составлявшие пептидную цепь, превращаются в гидразиды, за исключением С-концевой, присутствующей в реакционной смеси в виде свободной аминокислоты [13].

МЕТОДИКА

1. *Обезвоживание гидразина.* 100 г гидразинсульфата и 130 г NaOH смешивают в колбе и смесь перегоняют на масляной бане. Фракцию, полученную при 115°C и содержащую безводный гидразин, еще раз перегоняют над твердым NaOH.

2. *Гидразинолиз пептидов.* К высушенному пептиду добавляют несколько капель безводного гидразина, запаивают в толстостенной ампуле и инкубируют 6—16 ч при 115°C. По окончании инкубации пробу быстро упаривают в вакуумном эксикаторе над концентрированной H_2SO_4 . Остаток растворяют в нескольких каплях дистиллированной воды и смешивают с равным объемом бензальдегида. Образуется густая эмульсия, которую можно разделить на фракции лишь центрифугированием. Бензальдегидную фазу удаляют с помощью тонкого капилляра, а водную фазу упаривают. Остаток растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и хроматографируют в бутанольной системе.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Асп и Глу в ходе реакции почти полностью разрушаются; Арг теряет гуанидиновую группировку и превращается в Орн, Цис разрушается, а Мет окисляется в соответствующий сульфон.

2. При коротком гидразинолизе может отщепиться С-концевой пептид.

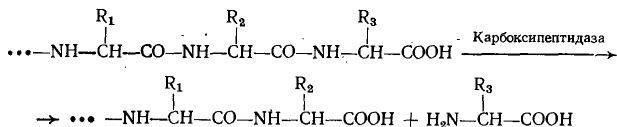
3. После встряхивания реакционной смеси с бензальдегидом эмульсию можно поместить в капилляр, запаять его и центрифугировать при низких скоростях. При этом коричневая бензальдегидная фаза и почти бесцветная водная фаза разделяются с четкой границей. Капилляр надламывают по этой границе и отбирают водную фазу для анализа сразу или после предварительного концентрирования.

4. Динитрофенилированием или дансилированием водной фазы после встряхивания с бензальдегидом можно определить С-концевую аминокислоту в виде соответствующего ДНФ- или ДНС-производного. Этот метод особенно удобен для белков, когда концентрация свободных аминокислот в водной фазе весьма мала.

5. Реакция гидразинолиза возможна и в количественном варианте. Правда, в ходе реакции часто могут возникать артефакты, а выход реакции, за некоторыми исключениями, равен 85%. Поэтому, если в результате получают С-концевой остаток в количестве, меньшем 0,5 эквивалента, следует применить другой аналитический метод для того, чтобы решить, является ли обнаруженная аминокислота действительно С-концевой или же это артефакт.

И. ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ

Карбоксипептидаза является экзопептидазой, которая расщепляет пептидные связи, соседние с концевыми COOH -группами. Место ферментативного гидролиза показано на следующей схеме:



Известны два типа карбоксипептидаз: А и В. Первая из них (А) неспособна отщеплять С-концевые основные аминокислоты, тогда как вторая (В) активна и в этих случаях.

Исследуемый белок инкубируют в присутствии карбоксипептидазы при соответствующих условиях. В ходе инкубации из смеси отбирают пробы, в которых определяют свободные аминокислоты и таким образом устанавливают С-концевую последовательность изучаемого белка или пептида.

МЕТОДИКА

1. *Предварительная обработка карбоксипептидазы.* Кристаллический фермент суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды и добавляют один объем 1%-ного NaHCO_3 . Смесь центрифугируют на холоду и вновь суспендируют на этот раз в 1%-ном NaHCO_3 . После этого фермент растворяют, медленно добавляя 0,1 н. NaOH , а затем доводят рН до 8 0,1 н. HCl и добавляют к раствору большой избыток (примерно 50-кратный) 0,1 М ДИПФФ, разведенного в изопропанол. Смесь оставляют стоять при комнатной температуре 90 мин.

2. *Расщепление карбоксипептидазой.* рН 0,5%-ного раствора исследуемого белка доводят до 8 в автотитраторе 0,01 н. NaOH под струей азота. Затем добавляют $1/30$ часть ДИПФФ-обработанной карбоксипептидазы. Гидролиз длится 2—16 ч с отбором проб через каждые 60 мин. Пробы, содержащие по 0,2—0,3 мкмоль субстрата, депротеинизируют 1 объемом 10%-ной трихлоруксусной кислоты, осадок удаляют фильтрованием и фильтрат пропускают через колонку амберлита IR-4B в ацетатной форме ($0,5 \times 5$ см) для удаления трихлоруксусной кислоты. После этого раствор упаривают в вакууме, остаток растворяют в нескольких каплях дистиллированной воды и хроматографируют в системе бутанол — вода или исследуют на аминокислотном анализаторе.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Ход реакции гидролиза, катализируемого карбоксипептидазой, в большой степени зависит от свойств субстрата. Нативность белков может препятствовать гидролизу, поэтому при получении отрицательных результатов следует повторить анализ на денатурированном субстрате.

2. Если белок состоит из нескольких неидентичных полипептидных цепей, как в случае гемоглобина, то данный метод непригоден для определения С-концевой последовательности. Гидролитические продукты двух (или более) различных полипептидных цепей при этом дадут весьма сложную смесь.

3. Боковые группы С-концевой аминокислоты заметно влияют на скорость реакции. Ароматические аминокислоты отщепляются довольно быстро, тогда как гидролиз аминокислот с небольшой нейтральной боковой группой идет очень медленно. Чистые препараты карбоксипептидазы А не способны отщеплять основные С-концевые аминокислоты (Лиз, Арг и Гис); эти остатки могут быть отщеплены карбоксипептидазой В, которая была выделена совсем недавно. Обычно имеющиеся в продаже препараты активны в отношении основных аминокислот, так как представляют собой смесь двух ферментов.

4. Как в белках, так и в пептидах имеются «устойчивые» пептидные связи, например связи в пролилпептидах не расщепляются карбоксипептидазой.

5. Карбоксипептидаза не способна отщеплять С-концевые амиды (например, глицинамид).

6. Если препараты карбоксипептидазы содержат слишком много примеси эндопептидазы, то предварительная инкубация с ДИПФФ не исключает возможности гидролиза других пептидных связей. В таких случаях рекомендуется перекристаллизовать фермент.

7. Препараты карбоксипептидазы обычно содержат значительное количество адсорбированных свободных аминокислот. Это обуславливает нежелательный высокий фон в контроле, (в нулевой точке). Поэтому следует перед опытом отмыть фермент несколько раз дистиллированной водой.

Цитированная литература

1. Blackburn S., Lowther A., Biochem. J., **48**, 126 (1951).
2. Brenner M., Niederwieser A., Pataky G., Experientia, **17**, 145 (1961).
3. Dévényi T., Acta Physiol., Acad. Sci. Hung., **9**, 321 (1956).
4. Edman P., Acta Chem. Scand., **4**, 283 (1950).
5. Edman P., Acta Chem. Scand., **7**, 700 (1953).
6. Fraenkel-Conrat H., J. Am. Chem. Soc., **76**, 3607 (1954).
7. Gray W. R., in: Colowick S. P. and Kaplan N. O., in Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. 11, pp. 129—469, 1967.
8. Gray W. R., Hartley B. S., Biochim. J., **89**, 379 (1963).
9. Hartley B. S., Biochem. J., **119**, 805 (1970).
10. Hill P. L., Spackman D. H., Brown D. M., Smith E. L., Biochem. Preparations, **6**, 35 (1958).
11. Levy A., Meth. Biochem. Anal., **2**, 360 (1955).
12. Lowther A., Nature, **167**, 767 (1951).
13. Niu C., Fraenkel-Conrat H., J. Am. Chem. Soc., **77**, 5882 (1955).
14. Porter R. R., Sanger F., Biochem. J., **42**, 287 (1948).
15. Röver M., Fabre S., Bull. Soc. Chim. Biol., **35**, 541 (1953).
16. Saigó M., Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung., **5**, 231 (1970).
17. Sanger F., Biochem. J., **39**, 507 (1945).
18. Woods K. R., Wang K. T., Biochim. Biophys. Acta, **133**, 369 (1967).

Рекомендуемая литература

- Colowick S. P., Kaplan N. O. eds., Methods in Enzymology, Vol. XXV, Academic Press, New York. London, 1972.
- Edman P., Needleman S. P. ed., Protein Sequence Determination, p. 211—256, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 1970.
- Fraenkel-Conrat H., Meth. Biochem. Anal., **2**, 383 (1955).
- Harris J. I., Meth. Biochem. Anal., **2**, 397 (1955).
- Narita K. in Needleman S. P. ed., Protein Sequence Determination p. 25—91, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970.

Глава XIV

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ. СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ. ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

(Р. КАЙЗЕР, и А. ПРОКС, ФРГ)

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время газовая хроматография (ГХ) стала одним из самых эффективных методов хроматографического анализа в органической химии, особенно при изучении летучих веществ.

ГХ — довольно простой метод; необходимое для него оборудование, относительно недорогое по сравнению с оборудованием для некоторых других инструментальных методов, надежно в работе. Для анализа достаточно нескольких миллиграммов вещества. Результаты анализа автоматически регистрируются в удобном для количественной оценки виде, а при наличии соответствующей аппаратуры количественное определение может быть полностью автоматизировано. Обычно для этого необходимо знать качественный состав образца. Однако существует возможность анализа смесей и с неизвестным составом. ГХ-анализ можно с успехом применять вместо других аналитических методов изучения структуры, если необходимо выбирать между несколькими возможными структурами неизвестного вещества. Для ГХ характерна исключительно высокая разрешающая способность; практически нет такой пары веществ, которую нельзя было бы разделить с помощью ГХ, хотя подчас это не удается сделать другими методами. Однако главное достоинство ГХ заключается в скорости выполнения анализа. За несколько минут и даже секунд результат анализа можно получить в виде либо колонки цифр, либо качественной или полуколичественной хроматограммы. Это наиболее явное преимущество ГХ перед другими методами. Как уже было сказано выше, ГХ является самым эффективным аналитическим методом для летучих веществ.

Аминокислоты не обладают летучестью, поэтому на первый взгляд кажется, что их нельзя определять с помощью ГХ. Однако, если вспомнить, что для чисто структурных анализов и для разделения смесей химическими способами получают множество производных исходного материала, окрашенных и имеющих различную растворимость, очевидно, можно надеяться найти способ приготовления для ГХ летучих и термостабильных производных из исходных нелетучих и легкоразрушаемых веществ. Таким образом, самые различные

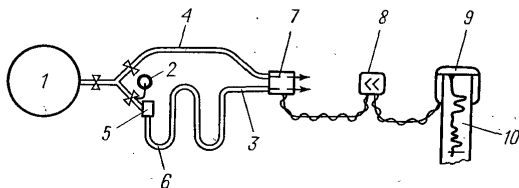
соединения, которые иначе анализируются лишь менее изящными методами, можно сделать доступными для анализа ГХ.

ГХ — это быстрый аналитический метод, пригодный для исследования всех веществ, которые можно испарить, т. е. летучих или способных превращаться в производные с такими свойствами. Для этих веществ с помощью ГХ можно получить как качественные, так и количественные данные. Аминокислоты могут быть превращены в летучие производные, и, следовательно, их можно анализировать ГХ, используя все преимущества данного метода.

ГХ используется прежде всего для анализа смесей. Для чистых веществ с помощью ГХ можно выявить степень их чистоты, определяя количество (и тип) примесей, а также установить химические, физико-химические и физические свойства веществ, даже если они находятся в смеси с другими компонентами. Однако для аминокислотного анализа эта последняя область применения ГХ не представляет особого интереса.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Для ГХ-анализа, разумеется, прежде всего необходим газовый хроматограф. Ниже дано описание этого прибора, подробное настолько, насколько это необходимо с точки зрения анализа производных аминокислот. Принцип работы прибора иллюстрирует фиг. 65. Прибор состоит из источника газа-носителя и различных измерительных и контрольных приборов, с помощью которых поддерживается постоянный поток газа. Газ-носитель, прежде чем попасть в колонку, проходит через дозатор, куда вводится 0,05—5,0 мг анализируемого вещества; здесь вещество испаряется и переносится газом-носителем в колонку (или капилляр). В колонке происходит разделение по принципу различного удельного давления паров компонентов и их различной растворимости в разделяющей жидкости. Различные скорости миграции компонентов обусловлены так-



Фиг. 65. Схематическое изображение газового хроматографа.

1 — резервуар с газом (чистым электролитическим H_2 , чистым N_2 , не содержащим кислорода, или чистым He); 2 — манометр; 3, 4 — измерительная и сравнительная линии потока газа-носителя соответственно; 5 — дозатор; 6 — колонка; 7 — детектор; 8 — электронная система для регистрации сигналов детектора (усилитель); 9 — милливольтметр с самописцем; 10 — хроматограмма.

же различными коэффициентами распределения между газовой и жидкой фазами. В силу всех этих причин время миграции компонентов через колонку различно. Длина набивной колонки чаще всего равна 2 или даже 10 м, а длина капилляров — 5—100 м.

В конце разделяющей колонки газ-носитель вместе с разделенными компонентами, которые все уже находятся в газовой фазе, попадает в детектор. Этот прибор дает измеряемый электрический сигнал, зависящий от концентрации вещества и регистрируемый самопишущим милливольтметром. В результате получают график изменения концентрации компонентов со временем (т. е. хроматограмму), на котором пики располагаются над базовой линией, соответствующей нулевой концентрации. Положение пиков можно охарактеризовать полным временем удерживания вещества, т. е. промежутком времени от момента нанесения образца до появления пика на самописце. Из этих данных можно вычислить действительное время удерживания и, исходя из параллельных сравнительных измерений, индекс удерживания, который характерен для данного изучаемого вещества.

Площадь под пиками отражает количество вещества, и это позволяет вычислить количественный состав смеси. Используя разные разделяющие жидкости и различную температуру и сравнивая время удерживания исследуемых и уже известных веществ, добавляемых к образцу, можно проводить качественный анализ. Если, например, в образце предполагается наличие производного Ала, то на хроматограмме должен появляться соответствующий пик в определенном предполагаемом месте. Производное Ала, добавленное к образцу, должно давать пик, который будет накладываться на пик изучаемого вещества. С помощью определенных реакций, при которых происходят превращения производного Ала, соответствующий пик на хроматограмме может быть удален или смещен. Некоторые другие приемы, которые здесь не обсуждаются, также помогают идентифицировать компоненты.

МЕТОДИКА

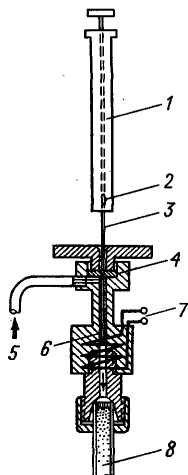
ВВОД ОБРАЗЦА

С помощью микродозатора аминокислотный раствор вводят в реактор, где под влиянием различных реагентов аминокислоты превращаются в летучие вещества. Если имеются уже готовые летучие производные, их прямо вводят в прибор. В любом варианте вносимый образец должен испариться в токе газа-носителя в процессе, протекающем в нагреваемой камере, куда вводят 5—50 мг образца в сухом виде или в виде концентрированного раствора (фиг. 66).

При изотермическом ГХ-анализе переход в газообразное состояние должен происходить очень быстро, за доли секунды. В то же время смесь не должна подвергаться изменениям, т. е. соотношение

веществ должно оставаться постоянным. Изменение соотношения веществ происходит в том случае, если вспомогательный материал, например растворитель, и легко летучая фракция образца испаряются очень быстро, а потом начинается испарение менее летучих фракций. Когда используют методику ГХ с программированием температуры, образцы наносят другим способом.

При ГХ-анализе производных аминокислот мы уже столкнулись с определенными трудностями. Если дозатор горячий, летучие образцы испаряются мгновенно без повреждения. Но если дозатор имеет слишком высокую температуру, то могут происходить химические превращения термолабильных веществ. Следовательно, успешное проведение анализа зависит от правильного выбора температуры.



Фиг. 66. Устройство для ввода проб (дозатор).

1 — шприц (например, гамильтоновский шприц на 10 мкл); 2 — объем, занимаемый образцом; 3 — игла; 4 — термостойкая резиновая прокладка; 5 — вход для газа-носителя; 6 — испарительная камера со сменными элементами; 7 — нагревательный элемент испарительной камеры; 8 — колонка.

РАЗДЕЛЕНИЕ

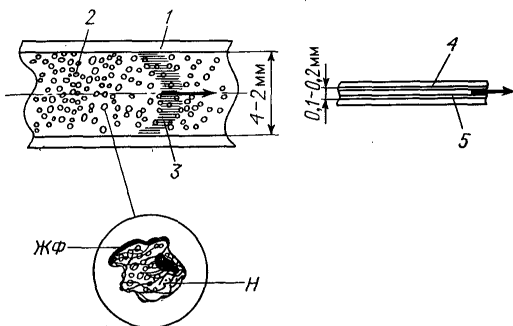
Испарившись в потоке газа-носителя, образец находится в условиях, близких к условиям вакуумной перегонки. Сильным разведением в инертном газе достигается его эффективная защита от дальнейшего повреждения. Выбор газа-носителя определяется используемым детектором (см. ниже), а также и другими факторами, которые следует принимать во внимание. Газ-носитель переносит испарившийся образец в ячейку прибора, где происходит разделение, зависящее от различных физических и химических параметров, обсуждаемых ниже.

СВОЙСТВА РАЗДЕЛЯЮЩЕЙ ЖИДКОСТИ

В выбранных условиях работы прибора жидкая фаза определяет порядок выхода различных производных аминокислот с разделяющей колонки и относительные расстояния между ними (см. табл. 13, стр. 306).

ТВЕРДАЯ ФАЗА

Твердая фаза (носитель) обычно представляет собой гладкую или шероховатую поверхность из чистого металла. Ею может служить также поверхность трубки, модифицированная каким-либо неорганическим соединением, на которой в виде пленки сконденсирована жидкая фаза. В последнем случае говорят о разделяющем капилляре, а методику в целом называют капиллярной ГХ [44] (фиг. 67).



Фиг. 67. Набивная колонка и открытый капилляр.

1 — трубка (из стали 6Х1 или 4Х1, стекла или других материалов); 2 — плотная набивка частицами носителя (Н) размером 0,20—0,25 или 0,10—0,12 мм (площадь поверхности 0,3—3 м²/г); носитель импрегнируется жидкой фазой (ЖФ) (0,5—20% по весу); 3 — одна из последних фракций, проходящая через колонку; 4 — капиллярная трубка, сделанная из стали, стекла или других материалов, с внешним диаметром 2 мм и внутренним диаметром 0,10—0,25 мм; 5 — пленка жидкой фазы толщиной 10^{-3} — 10^{-2} мм на внутренней поверхности капилляра.

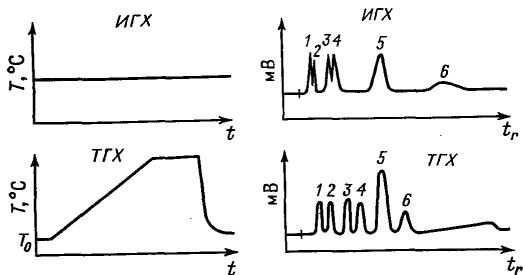
В качестве твердого носителя можно использовать также какой-либо неорганический пористый материал, например диатомовую землю [47], которую для ГХ аминокислот необходимо тщательно дезактивировать. Очень хорош в качестве твердой фазы, например, хромосорб G. При анализе аминокислот с большим успехом применяют твердые органические соединения (например, хромосорб Т), на которых получаются абсолютно симметричные пики даже для сильно полярных веществ.

ТЕМПЕРАТУРА

Рабочая температура или температурный градиент (т.е. скорость повышения температуры в град/мин в методике с программированием температуры) также влияют на процесс разделения (фиг. 68). Наряду с некоторыми недостатками метод с программированием

температуры имеет много достоинств; он позволяет получить наилучшие результаты на данной разделяющей колонке, если сравнивать его с другими методами.

Эффективность разделения зависит также от ряда других факторов: потока газа-носителя, длины колонки, перепада давления



Фиг. 68. Влияние температуры на разделение.

ИГХ — изотермическая газовая хроматография; температура постоянная. ТГХ — газовая хроматография с программированием температуры; температура увеличивается от T_0 до T . В обоих случаях смесь делится на 6 пиков.

и, что не менее важно, качества набивки колонки, которую можно охарактеризовать эффективностью колонки, выражаемой числом теоретических тарелок на метр длины колонки.

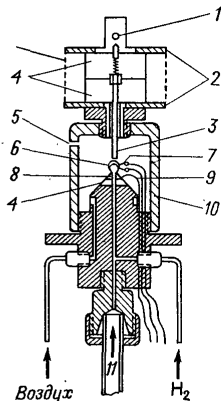
ДЕТЕКТИРОВАНИЕ, РЕГИСТРАЦИЯ, ИЗМЕРЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Из многочисленных детекторов, существующих в настоящее время, для количественного анализа аминокислот пригодны только детектор по теплопроводности, газовый денситометр и пламенно-ионизационный детектор. В детекторе теплопроводности для обеспечения достаточной чувствительности в качестве газа-носителя необходим гелий или водород, в газовом денситометре — азот или гелий, а в пламенно-ионизационном детекторе — высокоочищенный азот.

Поскольку для ГХ-анализа вообще и анализа аминокислот в частности характерно стремление к получению наилучшего разделения при минимальных затратах веществ, обычно предпочитают пользоваться наиболее чувствительным из всех детекторов — пламенно-ионизационным (фиг. 69).

Принцип метода. К границе слабого пламени, питаемого током высокоочищенного водорода (получаемого электролизом), со

скоростью 2—3 л/ч подводят ток газа-носителя. Если газ-носитель содержит органические соединения, то в радикальной реакции сгорания будут образовываться промежуточные сильно ненасыщенные полимерные вещества, которые легко ионизируются, а также полимерный углерод. В электрическом поле, создаваемом между горелкой (отрицательный полюс) и измерительным электродом,



Фиг. 69. Схематическое изображение пламенно-ионизационного детектора.

1 — место присоединения измерительного прибора; 2 — выступы для охлаждения электрода; 3 — стержневой стальной электрод; 4 — изоляция (тефлон); 5 — выход использованного газа; 6 — пламя; 7 — горелка с регулируемым пламенем; 8 — форсунка; 9 — подсоединение ионизирующего напряжения; 10 — экрани; 11 — выход с разделяющей колонки.

легко ионизируемые частицы отдают электроны и в результате образуется ионный ток (приблизительно 10^{-12} — 10^{-6} А). После соответствующих преобразований электронный компенсационный самописец регистрирует ионный ток в милливольтках (от 0,01 мВ до 1 В) как функцию времени удерживания.

Поправки, необходимые для количественной оценки, специфичны для каждого вещества и могут быть найдены с достаточной точностью путем калибровки или расчета, причем решающим фактором в этих расчетах является содержание углерода в исследуемом соединении [48].

Определяя количество вещества, следует помнить, что не зная качественного состава образца (если отсутствуют измерения или расчеты специфических поправок), трудно получить достоверные аналитические данные простым измерением площадей пиков, поскольку систематические ошибки измерений при этом могут превышать 10—15%. Вопрос количественных измерений в ГХ-анализе хорошо разобран Кайзером [48] (фиг. 70); ниже мы рассмотрим некоторые детали его.

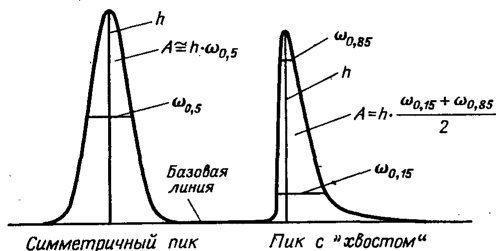
Для количественной оценки хроматограмм производных аминокислот существуют следующие возможности:

1. Применение неполярных и полярных неподвижных фаз и вычисление индексов удерживания и скачка индекса удерживания при переходе от неполярной фазы к полярной [46, 52].

2. Непосредственное сочетание газовой и тонкослойной хроматографии.

3. Соединение газового хроматографа с масс-спектрометром [13, 20, 33, 75, 97].

4. Одновременное использование двух детекторов, таких, как ячейка теплопроводности и пламенно-ионизационный детектор.



Фиг. 70. Количественная оценка хроматограмм: измерение площадей пиков с помощью приближенных методов (см. текст).

При использовании первой возможности окончательная идентификация достигается только при условии анализа большого числа стандартных образцов, тогда как сочетание ГХ с масс-спектрометрией обеспечивает самый простой и наиболее эффективный способ идентификации. В этом случае пик образца вместе с гелием (специально очищенным для этой цели) поступает через щель размером 0,1 мм (также омываемую чистым гелием) в стеклянный капилляр с внутренним диаметром около 0,005 мм, помещенный в систему высокого вакуума масс-спектрометра (например, спектрометра типа CN5, выпускаемого фирмой Atlas Mess- and Analysetechnik GmbH, ФРГ). ГХ-сигнал, поступающий из ионного источника, регистрируется самописцем обычным образом, как это делается в ГХ-детекторах. Развертывающее устройство дает сигнал во всех случаях, когда максимум пика проходит через систему. В этот момент (время запаздывания 0,1 с) с помощью фотоумножителя быстро сканируется (за несколько десятых секунды) вся область интересующих экспериментатора масс, и масс-спектр регистрируется самописцем (самопишущий УФ-гальванометр). Даже если некоторые пики накладываются друг на друга, такой анализ дает практически всю информацию, необходимую для полного установления структуры.

Хотя этот метод довольно дорогостоящий, он не имеет себе равных по эффективности анализа.

Вторая возможность — комбинация с тонкослойной хроматографией — при подходящих условиях также может привести к достоверной идентификации, причем это самый дешевый из комбинированных методов.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРИБОРАМ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ГХ-АНАЛИЗА ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

РАБОЧАЯ ТЕМПЕРАТУРА

Поскольку почти все виды производных аминокислот представляют собой молекулы с выраженной полярностью, обладающие ограниченной химической устойчивостью и заметной термолабильностью, необходимо подбирать для проведения анализа оптимальную температуру.

Контроль температуры должен распространяться на все ступени процесса: важна как температура, при которой образец вводится, так и температура конструктивных элементов трубок, главным образом металлических. Следует еще раз подчеркнуть, что процесс разделения, избирательность и время удерживания существенно зависят от температуры. Природные смеси аминокислот всегда сложны. Практически невозможно выполнить полный анализ смеси при одной температуре, поскольку, какой бы образец ни фракционировался, в смеси обычно присутствуют как высоко-, так и низкомолекулярные соединения с разной степенью полярности. Из сказанного ранее следует, что метод с программированием температуры является лишь разновидностью многоколоночного метода, в котором, например, три колонки используются при трех различных температурах, а детектор присоединен к каждой колонке. В таком ступенчатом температурном методе объединяются достоинства изотермического метода и метода программирования температуры — правда, при этом предъявляются очень высокие требования к аппаратуре. Маки-суми и Сароф [60] воспользовались этим комбинированным методом для разделения метиловых эфиров трифторацетиламинокислот (ТФА-аминокислот).

Особое преимущество ГХ с программированием температуры состоит в возможности работы с относительно холодным дозатором. Это позволяет предотвратить первичное термическое разложение анализируемого вещества даже при его высокой концентрации или в присутствии соединения, способного с ним реагировать. Более того, ГХ с программированием температуры (ТГХ) обеспечивает оптимальную температуру разделения для любой пары веществ.

чего нельзя достичь для всех компонентов на изотермической колонке. Вместе с тем ТГХ более сложна, чем изотермический анализ: длина колонки, способ пропитки и другие методические факторы не могут выбираться произвольно, а должны быть тщательно согласованы.

Существуют серьезные сомнения в отношении ценности слишком длинных колонок при ТГХ-анализе некоторых производных аминокислот [16]. Однако причиной того, что в определенных случаях разделение проходило хорошо на коротких колонках (от 0,5 до 2 м) и не удавалось на длинных (более 3—5 м), являются, по-видимому, структурные отличия и различная температурная зависимость относительных удерживаемых объемов полярных веществ. Эти трудности, возможно, удалось бы преодолеть подбором подходящего носителя и соответствующих количеств определенной жидкой фазы. Оптимальная скорость нагревания (град/мин) предопределена длиной колонки и общим количеством жидкой фазы, причем поток газа при этом должен тщательно регулироваться. Совершенно очевидно, что температура во всем объеме термостата не должна изменяться более чем на $\pm 0,5^\circ\text{C}$, однако ряд выпускаемых приборов не удовлетворяет этому требованию.

Величины удерживаемых объемов полярных соединений особенно чувствительны к температуре. Колебания неустановившейся температуры в разделяющей системе снижают четкость и, следовательно, эффективность разделения.

ВВОД ОБРАЗЦА

Как уже упоминалось, при проведении ТГХ дозатор должен быть как можно более охлажденным. В то время как при изотермической ГХ дозатор должен иметь температуру, более высокую, чем нижний предел интервала кипения исследуемой смеси, в ТГХ в крайних случаях он может нагреваться до температуры, которая на 150°C ниже точки кипения самой высококипящей фракции образца, если соблюдаются следующие условия: а) образец должен иметь минимально возможный объем, менее 1 мкл; б) при внесении образца не должно происходить его охлаждения; в) система должна быть обеспечена хорошей теплопроводностью и теплоемкостью; г) система должна быть химически инертной (поверхности должны быть чистыми, каталитически неактивными; обычно они состоят из окиси титана или кварца с наполнителями, повышающими теплоемкость); г) дозатор должен иметь съемные поверхности для испарения, чистоту которых можно легко проверять; д) температура дозатора должна быть стабильной, легко регулироваться и измеряться; температура влияет на количественную оценку хроматограммы, поскольку от нее зависит форма и высота пиков (если образец переохлажден, наблюдаются «хвосты»).

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ НАБИВКИ КОЛОНОК

Материал, используемый для набивки колонок, должен быть инертным. Для многих аналитических задач, которые в принципе могли бы быть решены ГХ, трудности связаны с химической активностью материала колонок. Стеклянные и кварцевые колонки позволяют, например, проводить количественный анализ следов кислот или прямой анализ перекисей (в первом случае благодаря уменьшенной адсорбции, а во втором — благодаря инертности материала), если в колонках не присутствуют металлы (медь, даже посеребренная или позолоченная, обычная или специальная сталь). Иногда нанесение на поверхность колонки пленки жидкой фазы очень хорошо сказывается на результатах эксперимента. Однако при этом необходима тщательная очистка и специальное импрегнирование, включающие описываемые ниже операции. Хорошо очищенную колонку заполняют дезактивированным носителем, который подвергали просеву, нагревают, например до 300°C сухим током азота, затем охлаждают и промывают жидкой фазой в нужной концентрации и в подходящем растворителе. Отмывку заканчивают, когда состав импрегнирующей смеси, подаваемой на колонку и выходящей с нее, становится одинаковым. После этого избыточную жидкость удаляют газом, а колонку высушивают в токе газа при достаточно высокой температуре. Температура колонки должна несколько повышаться на выходе колонки, чтобы избежать конденсации растворителя.

Для описанной процедуры пригодна любая температура, при которой не происходит неравномерного импрегнирования за счет локального концентрирования импрегнирующего раствора.

Если анализируемое вещество вводят не с помощью дозатора, а непосредственно в колонку или если колонка работает при высоких температурах, когда разделяющая жидкость заметно испаряется, то приходится считаться с присутствием в первой части колонки каталитически активного неимпрегнированного носителя в течение нескольких часов. Это обстоятельство может неблагоприятно сказываться на анализе, поскольку образец еще находится в нефракционированном и относительно концентрированном состоянии именно в этом месте, и, следовательно, здесь могут протекать химические реакции, искажающие ГХ-анализ.

Если нельзя набить всю колонку хромосорбом Т, следует набить этим очень инертным веществом хотя бы первую часть колонки. При тщательной набивке можно приготовить колонку, имеющую 1000 теоретических тарелок на метр (для сравнения: с хромосорбом В можно получить 1400 теоретических тарелок на метр для полярных разделяющих жидкостей и рабочей температуры 200°C; другие носители могут обладать даже более высокой разделяющей способностью).

Абсолютная инертность вещества-носителя не обязательна, если разделение ведут в капиллярах [19, 24, 44]. Хотя анализ полярных веществ в капиллярах также имеет свои недостатки, однако он все еще привлекает своей высокой разрешающей способностью при фракционировании аминокислот методом ГХ (разрешающая способность капилляра длиной 50 м с внутренним диаметром 0,25 мм достигает от 50 000 до 100 000 теоретических тарелок). По приговлению материалов для набивки колонок в настоящее время существует обширная литература.

Различными фирмами выпускается большое количество разнообразных носителей (например, фирмами Beckman Instruments Ltd., F&M Scientific, Abteilung Chemie der Hewlett-Packard Vertriebs GmbH, May and Baker Ltd., Perkin-Elmer and Co. GmbH), однако для анализа производных аминокислот необходима оптимальная наладка колонок в соответствии с конкретной задачей. Это касается не столько таких параметров колонки, как перепад давления и допустимое минимальное время анализа, сколько ее разделяющей способности (выражаемой числом теоретических тарелок на метр), равной

$$\frac{n}{L}; \quad n = \frac{t_{br} \cdot t_r}{(w_{0,5})^2} \cdot 5,54,$$

где n — число теоретических тарелок изотермической колонки (или капилляра); L — длина колонки (капилляра) в м; t_{br} — полное время удерживания исследуемого образца; t_r — время удерживания исследуемой фракции ($t_{br} = t_r + t_b$; t_b — время проскока; $w_{0,5}$ — ширина пика на половине высоты (полуширина пика).

В еще большей степени важна избирательность. Хотя в основном она определяется разделяющей жидкостью, в случае полярных веществ, какими являются все производные аминокислот, на нее оказывают влияние также свойства носителя, количество жидкой фазы на носителе и температура.

Все эти замечания сводятся к тому, что любые температурные данные о пригодности или непригодности жидкой фазы или набивочного материала колонки для определенного анализа должны рассматриваться критически. Если, например, сообщается о том, что в полиэфирной жидкой фазе аминокислоты разрушаются, то все же возможно, что трудности устранимы при более интенсивном, полном и равномерном импрегнировании или при выборе других материалов для носителя и колонки. В ГХ аминокислот большую роль играет хорошо подготовленная хроматографическая колонка — это основа качественного анализа и необходимое условие для количественного. Главная трудность хроматографии полярных веществ связана с наличием значительного «хвостового эффекта». Но и в этом случае химическая модификация носителей и поверхности колонки наряду с очисткой разделяющей жидкости и импрегни-

рующих веществ могут способствовать успеху в экспериментах.

Следы кислорода в импрегнирующем растворе или в газе-носителе могут сделать набивочный материал колонки химически активным за счет окисления. Следует также иметь в виду, что некоторые полярные вещества хорошо разделяются и элюируются только после того, как через колонку уже пропустили несколько образцов.

Поскольку каждый раз приходится учитывать множество различных факторов, простых и универсальных правил не существует. Действительно, опыт показывает, что приготовление хорошей хроматографической колонки—это почти искусство, требующее трудоемких и кропотливых экспериментов. Если 7 из 10 колонок для разделения полярных веществ оказываются хорошими (имеют от 1200 до 1500 теоретических тарелок на метр, обладают удовлетворительной механической и химической устойчивостью, а при фракционировании образцов в них отсутствуют «хвосты»), то можно быть довольным таким результатом. Подробный обзор простых технических операций приготовления колонок сделан Баро [3]. Жидкие фазы, использованные до настоящего времени для аминокислотного анализа, перечислены в табл. 13.

Таблица 13

Жидкие фазы для ГХ-анализа производных аминокислот

Жидкая фаза	Верхний предел температуры, °C	Источник данных
Неопентилглюкосукцинат	225	[16, 27, 38, 60, 131]
Карбовакс 1500 или 6000	148	[42]
Фторсиликоновый каучук	202	[66]
Силиконовый каучук SE 30	202	[66]
	310	[21, 123]
Полифениловый эфир OS 138	220	[21, 123]
Полигликоль 3000	180	[2]
Воранол 530	152	[2]
Силиконовое масло OE 4018/20 000	240	[72]

ГАЗОВЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ ДЛЯ АМИНОКИСЛОТНОГО АНАЛИЗА И ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К НИМ

Газовые хроматографы, имеющиеся в продаже, должны удовлетворять следующим требованиям:

1. Дозатор должен иметь сменную вводную трубку, чтобы можно было в различных экспериментах переходить от стеклянной системы к кварцевой. Вводная трубка должна монтироваться доста-

точно просто, поскольку ее приходится чистить довольно часто. В процессе работы необходимы регистрация и контроль температуры.

2. Во всем объеме термостата должна поддерживаться одинаковая температура без перепадов и флуктуаций, как при изотермической хроматографии, так и при хроматографии с программированием температуры. Термостат должен быть устроен так, чтобы замена колонок была достаточно простой операцией. Для работы необходимо иметь набор стеклянных и кварцевых колонок с прочными сочленениями, сохраняющими хорошую герметичность в течение длительного срока даже при частых заменах колонок. Как можно более короткие соединительные трубки должны иметь минимальный объем между дозатором и колонкой, а также между колонкой и детектором. Еще лучше соединить непосредственно дозатор, колонку и детектор без каких-либо соединительных трубок.

3. В детектировании участвуют детекторы, имеющие собственное постоянное термостатирование: термический детектор, газовый денситометр, микродетектор поперечного захвата и детектор захвата электронов. Детекторы должны легко присоединяться к различным приборам, с помощью которых проводится последующий структурный анализ вещества. Детекторы должны быть исключительно стабильны, очень чувствительны и доступны для очистки. Последнее требование, как правило, не обязательно в обычном ГХ-анализе, однако нужно следить за тем, чтобы оно выполнялось при анализе производных аминокислот.

4. Электронные приборы, самописцы и измерительные блоки должны удовлетворять критериям количественного ГХ-анализа. Но в действительности даже приборы самых последних выпусков могут иметь нелинейные характеристики. Особенность приборов, снабженных электрозахватными детекторами, заключается в том, что их характеристика нелинейна по природе.

Довольно трудно рекомендовать какой-либо прибор специального типа из имеющихся в продаже, который был бы наиболее подходящим для решения определенной задачи. К тому же самодельные приборы, используемые в специальных исследованиях аминокислотного анализа, иногда проявляют себя лучше, чем некоторые приборы, выпускаемые промышленностью.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ГАЗОВЫХ ХРОМАТОГРАММ

Несмотря на то что некоторые вопросы количественного определения уже затрагивались, здесь будет рассмотрен ряд других аспектов этой проблемы в связи с тем, что цель аминокислотного анализа всегда состоит в определении молярного аминокислотного состава пептида. Если не учитывать определенных условий и ограничений, в ГХ особенно велика вероятность получения неверных количественных результатов.

При количественной оценке газовых хроматограмм должны соблюдаться следующие условия, суммированные ниже. Образец следует испарять полностью и все компоненты пропускать через дозатор, трубки, колонку и детектор всегда одним и тем же способом, иначе нужно прибегать к анализу с помощью так называемых внутренних стандартов. В первом случае все компоненты определяют в виде пиков, поддающихся количественной оценке, а во втором каждый пик идентифицируют и рассчитывают отдельно.

Перед фракционированием проводят полную химическую обработку образца, а при хранении следят за тем, чтобы он не подвергался воздействию света, воды или воздуха (во избежание потерь при испарении или разложении).

Дозатор должен быть узким, чистым и достаточно нагретым. Минимальное количество образца вносят в специально подобранную колонку или капилляр и обеспечивают строго постоянный поток газа. Следует знать также, какие вещества разделяли в предыдущих экспериментах на данной колонке.

Хорошо известно, что оценка газовых хроматограмм производится путем измерения площадей индивидуальных пиков. Действительно, точно измеренная площадь пика дает величину, из которой может быть рассчитан конечный результат анализа. Однако с достаточной быстротой и точностью площадь пика можно измерить только с помощью электронных интеграторов. Применявшийся иногда способ планиметрического измерения площади вручную оказался на практике непригодным из-за слишком больших ошибок. Согласно другому методу, делают копию хроматограммы и после соответствующей обработки вырезают и взвешивают пики. Если отсутствует электронный интегратор с автоматической коррекцией нуля, перед тем как вырезать пики, необходимо провести базовую линию. После ее проведения полностью разрешенные пики отделяют друг от друга разделяющими линиями, а затем измеряют их площади.

Как показала практика, хорошие результаты можно получить, применяя следующие приближенные методы расчета:

$$1) A = h \cdot \omega_{0,5}; \quad 2) A = k \cdot h \cdot t; \quad 3) A = h \frac{(\omega_{15} + \omega_{85})}{2},$$

где A — площадь пика; h — высота пика; $\omega_{0,5}$ — ширина пика на уровне половины высоты; k — коэффициент; t — полное время удерживания; ω_{15} — ширина пика на уровне 15% высоты и ω_{85} — ширина пика на уровне 85% высоты.

Последний, третий метод особенно удобен для измерения пиков, которые имеют заметные «хвосты» (фиг. 70).

Когда площади пиков измерены, их нужно умножить на индивидуальные поправочные коэффициенты, специфичные для каждого вещества; в противном случае ошибка количественного анализа

может значительно превышать 15%. Поправочный коэффициент зависит не только от природы исследуемого вещества, но и от параметров прибора, в первую очередь от детектора. Поправочные коэффициенты, опубликованные в литературе, довольно неточные, к тому же они могут зависеть от количества определяемого вещества. Для пламенно-ионизационного детектора можно рассчитать приближенные поправочные коэффициенты [1, 48].

Поскольку при аминокислотном анализе желательно иметь значения количеств компонентов в молях, а данные ГХ-анализа дают весовые проценты, необходим соответствующий пересчет. Воспроизводимость данных количественной ГХ составляет в лучшем случае $\pm 1\%$; при тщательно подобранных условиях работы прибора воспроизводимость может быть улучшена до $\pm 0,2\%$. Общая точность аналитических данных часто составляет $\pm 10\%$, так как сюда входят ошибки, обусловленные предварительными препаративными стадиями работы. Для повышения ценности аналитических данных при вычислении простых погрешностей рекомендуется использовать методы математической статистики [49].

Ниже мы рассмотрим предварительную химическую обработку образцов для ГХ, а также критически разберем доводы в пользу или против различных методов.

СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Поскольку свободные аминокислоты имеют структуру цвиттер-иона, они представляют собой сильно полярные соединения с очень низким давлением паров и, следовательно, не пригодны для газохроматографического анализа. Устраняя электрический заряд, их превращают в более летучие соединения, причем это достигается различными способами. Однако для ГХ необходимо, чтобы образующиеся производные были не только достаточно летучими, но и обладали бы высокой термостабильностью. Чем более полярны производные, тем они более устойчивы к нагреванию, причем с увеличением полярности органических соединений увеличивается их время удерживания на колонке. Однако, как следует из соотношения между временем удерживания и температурой разделения, для того, чтобы получить величины удерживаемых объемов одного порядка, рабочую температуру нельзя выбирать произвольно. Это достаточно важный момент, поскольку при низкой термостабильности веществ в системе могут происходить неконтролируемые процессы разложения. При этом сигнал исчезает не всегда, часто он уменьшается, и появляется множество пиков. С точки зрения качественного и количественного аминокислотного анализа эти эффекты очень неблагоприятны, так как любое увеличение числа пиков

затрудняет оценку хроматограммы. В связи с этим существуют определенные принципы химического превращения аминокислот.

Прежде всего в результате данной обработки каждая природная аминокислота должна превращаться в специфическое производное. Если из разных аминокислот образуются идентичные продукты, то ясно, что соответствующая методика становится непригодной. К тому же желательно, чтобы реакции протекали количественно или по крайней мере с высокими выходами. Когда выходы разных аминокислотных производных значительно отличаются, при неблагоприятном соотношении компонентов смеси возникают серьезные осложнения в детектировании определенных аминокислот. Вопрос о количественной воспроизводимости образующихся производных мы обсудим ниже в связи с проблемой количественного анализа.

Совершенно очевидно, что число необходимых для превращения стадий должно быть минимальным, так как в результате многочисленных операций могут происходить большие потери и воспроизводимость экспериментов будет ухудшаться. В идеале было бы желательно произвести модификацию аминокислот в одну стадию, но в случае полифункциональных аминокислот, как правило, на это рассчитывать не приходится. Большое число реакций при модификации не выгодно и с другой точки зрения: обычно в аминокислотном анализе используются очень небольшие количества материала — несколько микромолей или даже меньше. Следовательно, превращение аминокислот необходимо проводить на микроуровне. С помощью газохроматографических детекторов с обычной чувствительностью определять такие небольшие количества довольно легко. К тому же вполне возможно, по крайней мере теоретически, увеличить чувствительность методов детектирования. Поэтому в настоящее время основные трудности связаны не с газохроматографическим детектированием производных аминокислот, а с микропрепаративным превращением аминокислот.

По химическим принципам многочисленные методы получения производных аминокислот можно разделить на две большие группы. К первой группе относятся методы, при использовании которых молекула аминокислоты как таковая не затрагивается — ее функциональные группы блокируются так называемыми защитными группировками. Методикам защиты аминокислот посвящена обширная литература. Для второй группы методов характерно существенное изменение молекулы аминокислоты, причем эта группа в свою очередь подразделяется на подгруппы. При химическом превращении одна или несколько функциональных групп аминокислоты замещаются на менее полярные группы или элиминируются в ходе направленной деградации молекулы аминокислоты. Пиролиз в этом смысле составляет исключение; он приводит к полному разрушению исходного соединения.

Возможности качественного и количественного анализа аминокислот с помощью ГХ и связанные с этим проблемы можно обсуждать только после того, как будут подробно рассмотрены известные в настоящее время методики превращения аминокислот. В результате быстрого развития этой области многие из них уже устарели. В деталях мы рассмотрим лишь несколько наиболее важных методов. Обзор соответствующих исследований, выполненных к настоящему времени, представлен в табл. 14, однако сводку данных, приведенную в ней, нельзя считать исчерпывающей.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПУТЕМ ЗАЩИТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП

При блокировании одной или нескольких функциональных групп молекула аминокислоты перестает быть цвиттерионом. Даже простая этерификация карбоксильных групп приводит к образованию заметно летучих эфиров [26]. Эфиры аминокислот в свободном состоянии впервые были выделены Байером и др. [5]. Однако эти соединения наряду с их высокой летучестью обладают рядом неблагоприятных свойств. Как правило, на обычных набивных колонках они дают большие «хвосты», поэтому для их разделения необходимы специальными образом приготовленные колонки, содержащие неактивный или инактивированный материал носителя. Более того, у свободных эфиров аминокислот имеется склонность к поликонденсации и образованию дикетопиперазинов, особенно при высоких температурах. В связи с этим при газохроматографическом разделении хлоргидратов *n*-бутиловых эфиров аминокислот в газ-носитель добавляли аммиак [78]. Хлоргидраты метиловых эфиров оказались не подходящими для анализа из-за термического разложения [65]; значительно лучшие результаты получали с соответствующими ацетатами. Точными количественными исследованиями стермостабильным внутренним стандартом было показано при этом, что никаких дикетопиперазинов не образуется. Сам факт обнаружения дикетопиперазинов, дипептидов сильно полярного характера, на колонках 2%-ного неопентилгликосукцината на флуоропаке 80 [121] вызывает недоумение. Однако возможность их образования в ходе процессов превращения или разделения всегда необходимо иметь в виду.

Одновременная защита NH_2 - и COOH -групп приводит не только к более высокой термической устойчивости, но также придает и другие свойства пептиду, выгодные для ГХ. Исключая из рассмотрения здесь другие возможные функциональные группы в молекуле аминокислоты, можно отметить, что эфиры *N*-защищенных аминокислот дают лишь небольшие «хвосты» и в соответствии с этим регистрируются в виде острых пиков. Аминогруппы защищали с помощью различных группировок, преимущественно ацильных

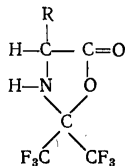
Производные аминокислот для газовой хроматографии

Производное	Получение из свободных аминокислот в последовательных реакциях		Изменения функциональных групп в молекуле аминокислоты	Источник данных
	первая реакция	вторая реакция		
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3 \\ \\ \text{R} \end{array}$	Метанол/HCl	Водн. NaOH/эфир	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OCH}_3$	[5]
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3 \\ \\ \text{R} \\ \text{CH}_3-\text{COO}^- \end{array}$	Метанол + кислый катализатор	(а) Действие щелочи (б) CH_3-COOH	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OCH}_3$	[65]
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}-\text{C}_4\text{H}_9-n \\ \\ \text{R} \\ \text{Cl}^- \end{array}$	n-Бутанол/HCl	—	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{O}-\text{C}_4\text{H}_9-n$	[78]
$\begin{array}{c} \text{CF}_3\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3 \\ \\ \text{R} \end{array}$	Метанол/HCl Метанол + кислый катализатор $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ метанол/ SOCl_2	$\text{CF}_3\text{COOCH}_3$ + щелочь в абс. метаноле $\text{CF}_3\text{COOCH}_3$ + щелочь в абс. метаноле CH_2N_2 /эфир $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OCH}_3$ $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}-\text{COCF}_3$ $-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OCH}_3$ $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}-\text{COCF}_3$ Различные замены $-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OCH}_3$ $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}-\text{COCF}_3$ $-\text{OH} \rightarrow -\text{O}-\text{COCF}_3$ $-\text{SH} \rightarrow -\text{S}-\text{COCF}_3$	[4] [115] [77] [96] [38] [32]
$\begin{array}{c} \text{CF}_3\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3 \\ \\ \text{R} \end{array}$	Метанол (SOCl_2) $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}$	$(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OCH}_3$ $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}-\text{COCF}_3$	[16]

	Метанол/HCl	$(CF_3CO)_2O$	$-OH \rightarrow -O-COCF_3$ $-SH \rightarrow -S-COCF_3$ Те же, что выше	[60]
$CF_3CO-NH-\underset{\substack{ \\ R}}{CH}-CO-O-$ $-C_4H_9-H$	n -бутанол/HCl + HCO— $-N(CH_3)_2$ $+ CH_3-\underset{\substack{ \\ OC_4H_9-H \quad OC_4H_9-H}}{C}-CH_3$ (а) Метанол/HCl (б) Переэтерификация с n -Бутанол/HCl	$(CF_3CO)_2O$ $(CF_3CO)_2O$	$-COOH \rightarrow -CO-O-$ $-C_4H_9-H$ $-NH_2 \rightarrow -NH-COCF_3$ $-OH \rightarrow -O-COCF_3$ $-SH \rightarrow -S-COCF_3$ Те же, что выше	[131] [27]
$CF_3CO-NH-\underset{\substack{ \\ R}}{CH}-CO-O-$ $-C_6H_{11}-H$	n -C ₆ H ₁₁ OH/HCl	$(CF_3CO)_2O$	$-COOH \rightarrow -CO-O-C_6H_{11}-H$ Те же, что выше	[18, 19] [88]
$CH_3CO-NH-\underset{\substack{ \\ R}}{CH}-CO-O-$ $-C_3H_7-H$ и другие эфиры	n -C ₃ H ₇ OH/HBr n -C ₃ H ₇ OH/C ₆ H ₆ + кис- лый катализатор	$(CH_3CO)_2O$ $(CH_3CO)_2O$	$COOH \rightarrow -CO-O-C_3H_7-H$ $-NH_2 \rightarrow -NH-COCH_3$ $-OH \rightarrow -O-COCH_3$ Те же, что выше	[81] [29]
$CH_3CO-NH-\underset{\substack{ \\ R \\ -C_4H_9-H}}{CH}-CO-O-$	n -Бутанол/HCl	$(CH_3CO)_2O$	$-COOH \rightarrow -CO-OC_4H_9$ $-NH_2 \rightarrow -NH-COCH_3$ $-OH \rightarrow -O-COCH_3$	[129]
$CH_3CO-NH-\underset{\substack{ \\ R \\ -C_5H_{11}-H}}{CH}-CO-O-$ и другие эфиры	n -C ₆ H ₁₁ OH/HBr	$(CH_3CO)_2O$	$-COOH \rightarrow -CO-OC_5H_{11}$ $-NH_2 \rightarrow -NH-COCH_3$ $-OH \rightarrow -O-COCH_3$	[42]

Производное	Получение из свободных аминокислот в последовательных реакциях		Изменения функциональных групп в молекуле аминокислоты	Источник данных
	первая реакция	вторая реакция		
$\begin{array}{c} \text{HCO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3 \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\text{HCOOH} + (\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$	CH_2N_2	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{COOCH}_3$ $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}-\text{CHO}$	[58]
$\begin{array}{c} \text{ДНФ}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3 \\ \\ \text{R} \end{array}$	2,4-динитрофторбензол в щелочном растворе	CH_2N_2 метанол/ BF_3	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OCH}_3$ $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}-\text{ДНФ}$	[66] [54]
$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ (\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{O}- \\ \\ \text{Si}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$	$(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{NR}_2$ или $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$	—	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ $-\text{OH} \rightarrow -\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$	[70] [24]
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{OCH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{R} \end{array}$	Этерификация	$\text{H}_2\text{CO} + \text{H}_2/\text{Pd}-\text{C}$		[18]
Фенилтиогидантоины	После деградации по Эдману			[66]
2-трифторметил-4-алкил-псевдо- оксазолон-5	$(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ CF_3COOH	—	Разнообразные реакции	[127]
Дихлортетрафтороксазолидинон $\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{N} \quad \quad \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{F}_2\text{ClC} \quad \text{CClF}_2 \end{array}$	$\text{F}_2\text{ClC}-\text{CO}-\text{CClF}_2$ в диметилсульфоксиде			[102]

Гексафтороксазолидинон

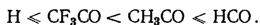


$\text{F}_3\text{C}-\text{CO}-\text{CF}_3$
в диметилсульфоксиде

[102]

$\text{HO}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOCH}_3$	HNO_2	CH_2N_2	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{CO}-\text{OCH}_3$	[56] [95]
$\text{Cl}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{COOCH}_3$	HNO_3/HCl	CH_2N_2 метанол/HCl	Неизвестны	[62]
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{OH}$	Этерификация	LiAlH_4		[98]
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{R}}{\text{CH}_2}$	Декарбосилирование			[8]
$[\text{R}-\text{CHO}]$	Щелочной раствор гипохлорита Нингидрин Нингидрин Нингидрин	(a) $-\text{CHO} \rightarrow \text{COOH}$ (б) $-\text{COOH} \rightarrow \text{COOCH}_3$	Различные реакции	[4] [37] [130] [3]
$\text{R}-\text{CN}$	N-бромсукцинимид			[86]
Разнообразные продукты	Пиролиз			[41] [89] [128] [28]

остатков. Их влияние на удерживание соответствующих аминокислотных производных было исследовано достаточно детально. Вейганд и др. [121], например, обнаружили, что величины удерживаемых объемов при присоединении ацильных остатков возрастают в следующем порядке:

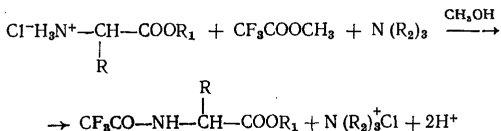


Аналогичные результаты получены и другими авторами [59, 79]. Гептафторбутирил- [91, 100] и пентафторпропионил-производные [91] удерживаются колонкой еще меньше, чем N-трифторацетил-производные. Благодаря исключительным свойствам трифторацетильных остатков (ТФА) соответствующие производные приобрели в последнее время большое значение в ГХ-анализе аминокислот.

ТФА-группу в химии пептидов стали использовать после появления работы Вейганда и Сендеса [103]. Относительно высокое давление паров ТФА-производных способствует их разделению и очистке путем возгонки в высоком вакууме [108] и дробной перегонки [109]; в некоторых случаях это явление было детально исследовано [113]. Применение этих производных для ГХ аминокислот и пептидов казалось вполне оправданным. Байер и Дести [4] по предложению Вейганда [99] первыми исследовали разделение метиловых эфиров N-ТФА-аминокислот. В последующей работе наряду с варьированием хроматографических условий использовали различные эфирные группировки (см. табл. 14). Последовательность стадий образования производных в большинстве случаев одинакова: аминокислоты сначала соответствующим методом этерифицируют, а затем трифторацетилируют.

Обратный порядок — ацилирование свободных аминокислот трифторуксусным ангидридом в безводной трифторуксусной кислоте [117] — не подходит, особенно для количественного получения этих соединений. В зависимости от взятого количества ангидрида и от условий реакции при этом образуются азлактоны [110, 127] и смешанные ангидриды [117, 125]; к тому же превращение Гис и Три протекает с невысокими выходами [16]. При ацилировании свободных аминокислот тиоэтиловым эфиром трифторуксусной кислоты в щелочном растворе получают самые различные выходы [14], причем диаминокислоты Лиз и Орн дают только ϵ -N-ТФА-производные, и, следовательно, их можно трифторацетилировать по α -положению с помощью других методов.

При трифторацетилировании эфиров аминокислот ацилирующий агент определяет тип образующегося производного. Обработка метиловым эфиром трифторуксусной кислоты в абсолютном метаноле с добавлением эквивалентного количества третичного основания [109] приводит к ацилированию только свободных аминогрупп [77, 115]:



В зависимости от строения эфиров аминокислот скорости их ацилирования значительно различаются. Так, например, большие отличия в сигналах при анализе смеси эквимольных количеств замещенных Гли, Лей и Иле с помощью пламенно-ионизационного детектора [77] можно было бы объяснить неполным ацилированием Иле из-за стерических трудностей, возникающих при его взаимодействии с ацилирующим агентом. Неполное ацилирование может быть одной из причин появления нескольких пиков для одной аминокислоты.

Вместе с тем при ацилировании трифторуксусным ангидридом с добавлением подходящего растворителя или без него реакция протекает не только быстрее и полнее, но при этом непосредственно ацилируются хлоргидраты эфиров [16, 19, 27, 32, 60, 88]. По аналогии с производными свободных аминокислот [126] таким образом можно получить соответствующие N, O-бис-ТФА-производные аминокислот Сер, Тре, Тир и Опр. Соответственно реакция с хлоргидратом Цис приводит к N, S-бис-ТФА-производному. Степень ацилирования эфиров полифункциональных аминокислот сильно зависит от условий реакции и времени инкубации с трифторуксусным ангидридом [19, 53, 60]. При кратковременном ацилировании было обнаружено образование только N-ТФА- производных оксиаминокислот [53], для которых характерны большие величины удерживаемых объемов.

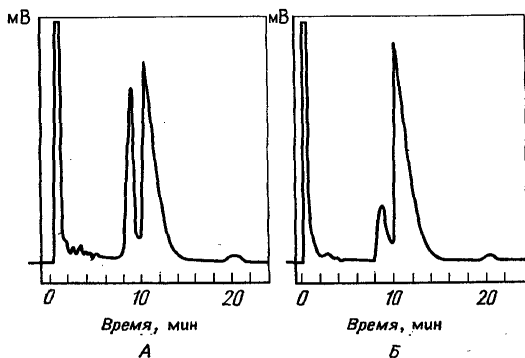
Превращение основных аминокислот также имеет специфические особенности. Макисуми и Сароф [60] нашли, что Три ацилируется и по индольному азоту, однако для количественного образования этого продукта необходимо относительно длительное ацилирование [53] — в противном случае на хроматограмме появляются два пика. ТФА-группа при индольном азоте довольно устойчива к метанолизу [60]. При трифторацетилировании хлоргидрата эфира Арг можно обнаружить только N,N-бис-ТФА-производные эфира Арг; в препаративных опытах не найдено образования соответствующего три-N-ТФА-производного [118]. Сообщение о гомогенности вышеописанных ТФА-производных противоречит данным, опубликованным ранее [16]; по-видимому, это можно объяснить различными условиями реакции [60]. Крукшенк и Шиэн [16] обнаружили также частичное расщепление гуанидиновой группы, в результате которого образуется эфир бис-ТФА-Орг и другие неидентифицированные продукты. Ситуация с превращением эфира Гис пока не ясна: на газовой хроматограмме получен асимметричный пик

с относительно большим объемом удерживания; если учесть значительный разброс количественных данных, этот результат может указывать на разложение вещества в ходе процесса. С другой стороны, после продолжительной инкубации с трифторуксусным ангидридом наблюдали острый пик, удерживаемый объем которого составлял $1/_{16}$ соответствующей величины вышеупомянутого N-ТФА-Гис [60]. Остается неясным, является ли этот продукт N^{im} , N^a -бис-ТФА-соединением. Литературные данные об условиях ацилирования (касающиеся ацилирующего агента), о собственно ацилировании и о получаемых продуктах не однозначны, поэтому очень трудно выявить превосходство какой-либо из предлагаемых методов.

Для проведения ГХ-анализа одинаково важны как химическая, так и термическая устойчивость рассмотренных выше производных. Химическая устойчивость прежде всего определяет условия обработки, хранения и дозирования образцов. Как уже упоминалось, в результате слишком длительного анализа одного и того же образца могут образовываться несколько продуктов и, следовательно, получаться неоднозначные данные. Если ТФА-производные эфиров простых моноаминомонокарбоновых кислот — устойчивые вещества, которые могут храниться неограниченное время, то этого нельзя сказать о производных аминокислот сложной структуры, содержащих несколько ацильных групп. Большинство таких соединений крайне чувствительны к гидролизу и частично разлагаются в присутствии следов воды [53]. У оксиаминокислот Сер и Тре это может привести к полной потере защитных групп, так как кислота, образующаяся при гидролизе О-ТФА-группы, по типу кислотно-основного катализа может способствовать N—О-ацильной миграции и таким образом вызвать полную потерю N-ТФА-групп [126]. Рекомендуется эти соединения хранить и даже вносить в прибор в присутствии избытка трифторуксусного ангидрида, к которому могут добавляться другие растворители.

Что касается термической устойчивости этого класса соединений, то ситуация здесь такая же: производные простых аминокислот термостабильны и не разлагаются в ходе ГХ-анализа, а N-ТФА-производные Сер и Тре, имеющие свободные оксигруппы, обнаруживают тенденцию к β -элиминированию воды при возгонке в высоком вакууме [126]. Эта тенденция еще более усиливается при О-ацилировании. Фиг. 71 показывает, что такое β -элиминирование имеет место в ходе испарения перед ГХ-анализом [53]. Видно, что *n*-бутиловый эфир бис-ТФА-Тре дает два сигнала, первый из которых возрастает с увеличением температуры испарения. Совершенно аналогичные результаты были получены с метиловым эфиром N-ТФА-Цис: при очень высоких температурах в системе можно было обнаружить только метиловый эфир N-ТФА-амиоакриловой кислоты [105]. Возникающие трудности можно обойти, вводя обра-

зец на колонку при относительно низкой температуре с последующим программированием температуры [53]. Однако некоторые данные говорят о том, что необходимо более критически оценивать ситуацию — они были получены при исследовании большого числа разделяющих фаз для ГХ *n*-амиловых эфиров ТФА-аминокислот [19]. Авторы обнаружили каталитическое влияние некоторых поли-



Фиг. 71. Термическое разложение *n*-бутиловых эфиров бис-ТФА-Тре при различных температурах испарения [53].

Разделение проводили на стальной колонке (длина 1 м, внутренний диаметр 0,4 см), содержащей 1% неопентилгликоксукцината на газохроме А (60–80 меш); температура колонки 93°C; скорость потока N_2 37 мл/мин; температура испарения 223°C (А) и 142°C (Б).

эфирных фаз на разложение О-ТФА-производных оксиаминокислот. Высота пика зависела от того, сколько времени вещество находилось на колонке. Иногда параллельно образовывалось N-ТФА-соединение со свободной ОН-группой, иногда же вообще не обнаруживали никакого пика. По-видимому, сначала отщепляется О-ТФА-остаток, а затем посредством N—О-ацильной миграции может происходить отщепление всех N-защитных групп и в результате — исчезновение пика [19].

Количественные исследования воспроизводимости параметров ГХ метиловых эфиров ТФА-аминокислот показали, что происходит частичное разложение этих производных, причем обычно главную роль в этом процессе играет термическое β -элиминирование [16]. Имеется слишком мало данных, чтобы можно было судить о термостабильности производных основных аминокислот, к тому же, как правило, для них наблюдали относительно малые пики [16, 17].

Можно было бы ожидать, что подобные явления присущи всем ТФА-производным и совершенно не зависят от конкретной эфирной

группы. Ряд авторов использовали для защиты карбоксильных групп эфиры высших спиртов. Как продемонстрировали Маки-суми и др. [59], удерживаемый объем образующихся производных с увеличением молекулярного веса, как и следовало ожидать, увеличивается. Для процесса получения производного пониженная летучесть является преимуществом, поскольку при испарении избытка растворителя в токе азота [19] или в вакууме при комнатной температуре [53] для метиловых эфиров ТФА-аминокислот, например, характерны заметные потери.

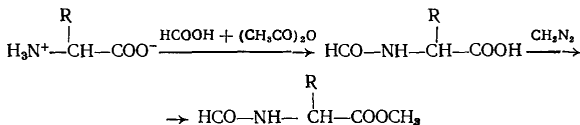
В ряде методик превращения аминокислот первый шаг состоит в этерификации свободных аминокислот [31], образование метиловых эфиров которых затруднено, тогда как этерификация N-защитенных аминокислот (N-формиламинокислот или ДНФ-соединений) идет довольно легко в метаноле / BF_3 или диазометане. В литературе описано множество различных методов этерификации, однако количественные характеристики этой реакции у разных авторов не согласуются друг с другом. Кроме классической реакции в присутствии соляной кислоты и метанола [4, 5, 115], используют реакции, в которых в качестве катализаторов применяются кислые ионообменные смолы [65, 77]. Но лучшие результаты были получены при введении в метанольную смесь, где происходит превращение аминокислот, сухого газообразного HCl [60]. Хаген и Блэк [32] проводили реакцию в метаноле в присутствии SOCl_2 по методу Буассона и др. [12], а Крукшенк и Шиэн [16], основываясь на данных Восса и Бланке [94], добавляли также $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}$. Высшие эфиры обычно образуются гораздо труднее и только при условии, что выделяющаяся вода одновременно удаляется из смеси, где протекает реакция. Это может достигаться, например, в присутствии избытка этанола и с помощью азеотропной отгонки водно-этанольной смеси в ходе этерификации [129], причем в качестве кислоты в смесь вносят HBr [42].

Другой способ удаления воды рекомендован Зомзели и др. [131]. Основываясь на ранее описанной методике [57], авторы добавляли к кислому этанольному раствору кеталь, полученный из соответствующего спирта и ацетона (диалкоксипропан). Кеталь удаляет воду, используя ее на расщепление до спирта и ацетона. Однако, согласно некоторым данным [19], ни метод Джонсона и др. [42] с использованием HCl вместо HBr , ни последняя методика [131] не годятся для получения *n*-амиловых эфиров. Применение кислых ионообменных смол [77] также не привело к удовлетворительным результатам. Количественное образование *n*-амиловых эфиров идет лишь при более высокой температуре и при введении в смесь газообразного HCl [19]. Превращение аминокислот в высшие эфиры затруднено тем, что определенные аминокислоты, такие, как цистин, очень плохо растворимы в спиртах, насыщенных HCl . *n*-Бутиловые эфиры были приготовлены [53] переэтерификацией

хлоргидратов метиловых эфиров аминокислот в смеси HCl — бутанол при высокой температуре, поскольку соли метиловых эфиров довольно хорошо растворяются в высших спиртах.

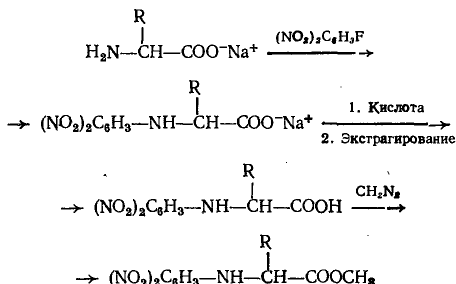
В отличие от эфиров ТФА-аминокислот ацетиламинокислоты, впервые изучавшиеся Янгсом [129] в виде *n*-бутиловых эфиров, менее летучи и, следовательно, имеют больший удерживаемый объем. По-видимому, полярные основные аминокислоты, такие, как Арг, а также Гис, Три и цистин, вряд ли можно подвергать газовой хроматографии. Их нет среди 35 аминокислот (в том числе 18 природных), разделенных с помощью ГХ в виде *n*-амиловых эфиров Джонсоном и др. [42]. Эти авторы разделяли также *n*-бутиловые, изобутиловые и изоамиловые эфиры, приготовленные аналогично ТФА-производным. Эти эфиры получали в виде бромгидратов, а затем прямо ацетилировали уксусным ангидридом. Известно, что при этом из оксаминокислот образуются также N, O-диацетильные соединения, но пока нет никаких данных о том, как взаимодействует ангидрид с другими полифункциональными аминокислотами. По сравнению с соответствующими ТФА-производными O-ацетилсоединения гораздо меньше подвержены гидролизу и, по-видимому, обладают более высокой термоустойчивостью; правда, соответствующих количественных измерений еще не проводили. В литературе описано разделение *n*-пропиловых эфиров ацетиламинокислот [29], но подробные методики не были опубликованы.

Те же ограничения, что и для эфиров ацетиламинокислот, относятся к метиловым эфирам N-формиламинокислот, полученным и разделенным на газовом хроматографе Лоссе и др. [58]. Эти соединения тоже очень слабо летучи и имеют относительно большие удерживаемые объемы. Их можно приготовить обработкой свободной аминокислоты смесью муравьиной кислоты и уксусного ангидрида с последующей этерификацией диазометаном (см. ниже). Из полифункциональных аминокислот исследовали поведение при ГХ лишь Глу и Асп. Диметиловый эфир N-формил-Глу при нагревании превращается в метиловый эфир пирролидон-карбоновой кислоты, и в таком виде его обнаруживают в газовом хроматографе. Несмотря на то что формильные производные простых аминокислот образуются с высокими выходами, эти соединения до сих пор еще не использовали для аминокислотного анализа:



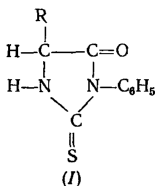
ГХ-анализ метиловых эфиров ДНФ-аминокислот представляет интерес с двух точек зрения [66]. Во-первых, ДНФ-аминокислоты

получают в ходе деградации пептида по Сэнгеру [76] и их быстрое и чувствительное детектирование в газовом хроматографе идеальным образом могло бы дополнить этот важный аналитический метод определения последовательности аминокислот. Во-вторых, как показано в работах Лендоуна и Липски [54], эти соединения с крайне высокой чувствительностью можно определять с помощью электронозахватного детектора. Большим преимуществом ГХ-анализа ДНФ-производных является то, что другие сопутствующие вещества с такими же хроматографическими свойствами не регистрируются, и поэтому в результате получается довольно простая аналитическая картина. Реакция образования ДНФ-аминокислот при действии на свободные аминокислоты 2,4-ДНФБ в слабощелочном водном растворе протекает количественно, так же как и последующая этерификация diazometаном или BF_3 в метаноле:

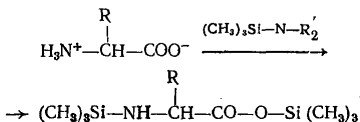


Все эти свойства чрезвычайно выгодны для ГХ, но недостатками ДНФ-производных являются высокая полярность и относительно низкое давление паров. К настоящему времени достаточно изучена хроматография только ДНФ-производных простых аминокислот. Из-за процессов разложения при необходимых высоких температурах метод оказался непригодным для Сер, Тре, Три и Гис. Есть сообщение [54] о том, что обнаружены метиловые эфиры бис-ДНФ-Лиз и бис-ДНФ-Орн, но данные о соответствующем эфире Арг отсутствуют. Как показано при исследовании пептидов неизвестного строения [40], метод применим для количественного анализа простых аминокислот.

Пожалуй, следует упомянуть и о ГХ-анализе фенилтиогидантоинов (I) аминокислот [66]. К этим соединениям, образующимся, как известно, при деградации по Эдману [22], относится все то, что говорилось о метиловых эфирах ДНФ-аминокислот; их разделение с помощью ГХ представляет интерес только в связи с деградацией пептидов.

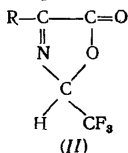


Реакция солей аминокислот с триметилхлорсиланом [70] или реакция свободных аминокислот с триметилсилилдиалкиламинами [9] приводит к образованию триметилсилиловых эфиров N-триметилсилиламинокислот [70], что означает получение в одну стадию производных аминокислот, пригодных для газовой хроматографии:

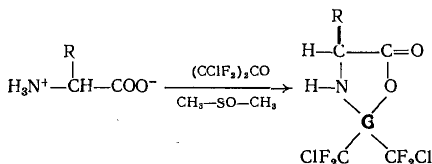


Эти соединения чрезвычайно легко гидролизуются, и тем не менее их образование может быть количественным [71]. Однако в экспериментах на газовом хроматографе было показано, что данные производные не подходят для количественного аминокислотного анализа [73]. Высокая чувствительность этих соединений к воде, наличие OH-, SH-, NH₂- и COOH-групп способствуют, как и в случае О-ТФА-производных [131], их частичному разложению в ходе разделения на колонке. Эти эффекты можно предотвратить только предварительным добавлением больших количеств триметилсилилдиэтиламина. Однако возникающие в связи с этим осложнения и остающаяся неопределенность указывают на то, что эти соединения не стоит, пожалуй, использовать для ГХ.

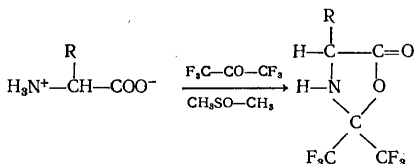
2-трифторметил-4-алкилпсевдооксазолон-5 (II), исследованный Вейгандом и др. [127], также оказался непригодным для определения аминокислот, несмотря на его исключительно благоприятные свойства для ГХ. Дело в том, что из-за побочных реакций образование производных протекает незначительно [84] и, кроме того, некоторые аминокислоты не доступны для реагента или не подвергаются его воздействию непосредственно [127]:



Как было впервые показано Симмонсом и Вилли [82] для Ала и впоследствии Вейгандом и др. [127] для большого числа других аминокислот, в результате реакции свободных аминокислот, суспендированных в абсолютном диметилсульфоксиде, с симметричным дихлортетрафторацетоном при комнатной температуре образуется тризамещенный 2,2-(бис-хлор-дифторметил)-оксазолидин-5 (дихлортетрафтороксазолидинон):



Эти соединения прекрасно разделяются в газовом хроматографе. Еще более подходящим и летучим является 4-замещенный 2,2-(бис-трифторметил)-оксазолидин-5(гексафтороксазолидинон), полученный пропусканием через суспензию аминокислоты в диметилсульфоксиде или тетрагидрофуране газообразного гексафтор-ацетона при низкой температуре [102]:



Образование подобных соединений из простых аминокислот протекает с высокими выходами. Что касается полифункциональных аминокислот, пока нет достаточно убедительных данных об их качественной и количественной хроматографии. С помощью указанных производных можно быстро и количественно разделить даже такие стереоизомеры аминокислот, как Иле и *алло*-Иле; они могут применяться также для различных количественных определений [116]. Следует упомянуть, что гексафтороксазолидиноны даже более летучи, чем соответствующие метиловые эфиры ТФА-аминокислот.

ОБРАЗОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ ХИМИЧЕСКОМ ПРЕВРАЩЕНИИ АМИНОКИСЛОТ

В результате защиты функциональных групп аминокислот образуются более летучие и, по крайней мере частично, менее полярные соединения. При этом, однако, происходит также зна-

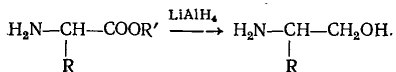
чительное увеличение молекулярного веса, а в определенных случаях и чрезмерное усложнение молекулы аминокислоты. Например, у Сер и Тремолекулярный вес при трифторацетилировании возрастает более чем в 2 раза. В результате «перегрузки» молекулы термолабильность таких аминокислот может увеличиться — с другой стороны, некоторые соединения пригодны для ГХ только при введении нескольких защитных групп.

Низкая летучесть аминокислот является в первую очередь следствием полярного распределения зарядов, вызванного одновременным присутствием основной NH_2 - и кислот COOH -групп. Можно было бы ожидать, что элиминирование одной и в особенности обеих групп приведет к образованию летучих веществ. Как показано в ряде исследований, это действительно так. Однако в этих работах удовлетворительные результаты получены только для простых аминокислот. Ценность некоторых методик невелика из-за образования побочных продуктов, поэтому мы упомянем их только для полноты картины ГХ аминокислот, но не будем рассматривать подробно, тем более что ни одна из них не приобрела значения ни для качественного, ни для количественного анализа аминокислот.

Обработка свободных аминокислот азотистой кислотой приводит к образованию α -оксикарбоновых кислот, которые после этерификации диазометаном разделяли ГХ [56]. Однако последующие работы [95] показали, что образование этих продуктов деградации ни в коей мере не является количественным. При этом обнаружили, что часто протекают побочные реакции (правда, их можно избежать в подходящих условиях), а выходы продукта сильно варьируют и очень низки.

Аналогичная ситуация описана Меламедом и Ренардом [62] при образовании α -хлоркарбоновых кислот в реакции с HNO_3/HCl ; здесь производные получили только из простых аминокислот, а для остальных либо наблюдали множество пиков, либо пики вообще отсутствовали. Эти соединения также разделялись в виде метиловых эфиров.

Как показано исследованиями Каррера и др. [51], аминокислоты, соответствующие определенным аминокислотам, можно получить с хорошим выходом из эфиров аминокислот в реакции с LiAlH_4 :



Некоторые аминокислоты, главным образом N-замещенные [98], были подвергнуты ГХ-анализу.

ОБРАЗОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ ДЕГРАДАЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Во всех рассмотренных до сих пор методах, несмотря на превращения, структура аминокислоты в принципе сохранялась. В какой-то степени это справедливо и для аминов, полученных Биром и Тейтельбаумом [8] при декарбоксилировании аминокислот (этот метод, однако, в дальнейшем не использовался). Для идентификации замещенных аминокислот решающим фактором является то, что продукты деградации различаются по своим свойствам. Окислительная деградация в щелочном растворе гипохлорита [55] приводит к образованию альдегида, в молекуле которого на один углеродный атом меньше, чем в исходном соединении. Однако изучение этой реакции для применения в ГХ [4] выявило некоторые моменты, говорящие об ограниченности ее использования в данных целях.

Было обнаружено, что из простых аминокислот соответствующие альдегиды образуются количественно, а из кислых и серусодержащих аминокислот получается несколько различных продуктов, причем различные аминокислоты могут давать одинаковые продукты разложения и поэтому в дальнейшем эта методика не применялась. Аналогичным образом окисление свободных аминокислот N-бромсукцинимидом в водном растворе [86], приводящее к нитрилам, содержащим на один атом углерода меньше, не пригодно для ГХ, поскольку и здесь наблюдаются побочные реакции, главной из которых является образование соответствующих альдегидов.

Первым методом превращения аминокислот для использования в ГХ-анализе была реакция с нингидрином. Как известно, в этой реакции наряду с окрашенными веществами и CO_2 образуются и упоминавшиеся выше альдегиды, имеющие на один углеродный атом меньше, чем в исходной молекуле. Опираясь на метод количественного определения аминокислот, разработанный на основе этой реакции [92], с помощью ГХ удалось разделить и идентифицировать эти летучие альдегиды [37]. Очевидно, этот метод пригоден только для тех аминокислот, которые в реакции с нингидрином дают летучие альдегиды, и, следовательно, из этой группы, естественно, исключаются Про и родственные ему аминокислоты [61]. Побочные реакции при ГХ, такие, как полимеризация, затрудняют или вообще делают невозможным идентификацию определенных аминокислот [130]. Чтобы преодолеть указанные трудности, альдегиды окисляли [3] до карбоновых кислот и хроматографировали в виде метиловых эфиров. Несмотря на отмеченные недостатки, Златкис и др. [130] указывают, что этот процесс модификации аминокислот интересен в техническом отношении. По принципу реакций, используемых в ГХ, превращение аминокислот, а затем разделение и количественное определение альдегидов, переводимых в результате каталитического гидрокрекинга в метан, может происходить

как непрерывный процесс, причем реакции протекают в водном растворе, содержащем нингидрин. Однако этим методом количественные данные смогли получить только для 7 простых аминокислот, поэтому, если учесть, что для обнаружения таких аминокислот имеется ряд более простых способов, применение его кажется малооправданным.

ПИРОЛИЗ АМИНОКИСЛОТ

В результате пиролиза органических соединений образуются разнообразие летучие продукты, которые могут быть разделены ГХ. Во многих случаях получают характерные пиролитические хроматограммы, по которым можно установить исходную молекулу. Как впервые было показано Янаком [41] и позднее Улехла [89], это справедливо и для многих аминокислот. Вид пиролитической хроматограммы, так же как тип образующихся продуктов и их количественный состав, всегда сильно зависит от конкретных условий пиролиза. Так, при низкой температуре пиролиза (300° С) Винтер и Альбро [128] получили в основном амины. Исследования различных смесей аминокислот привели к заключению, что в силу такой заметной зависимости от условий реакции допустимы только качественные выводы. Тем не менее при использовании точно воспроизводимых условий было показано, что индивидуальные аминокислоты и даже относительно простые смеси можно количественно определять по пиролитическим хроматограммам [28]. Большим преимуществом метода является сравнительно малое количество требуемого для хроматографии материала. Все же вполне очевидно, что пиролитический анализ более сложных смесей аминокислот представляет собой трудную задачу. Только дальнейшие эксперименты покажут, возможно ли при наложении пиков проводить идентификацию и количественно определять аминокислоты в смеси.

Так как в подобных исследованиях других классов соединений было показано, что среди продуктов распада характерными являются как раз наименее летучие, то желательно использовать колонки с высокой разрешающей способностью и работать в режиме с программированием температуры. В таких экспериментах наиболее эффективна капиллярная хроматография с программированием температуры или с поддержанием постоянной температуры пиролиза. Подбирая подходящие металлические сплавы и нагревая их индукционным методом до точки Кюри, можно обеспечить достаточно быстрый и воспроизводимый нагрев для пиролиза. Другое необходимое требование заключается в очень малой толщине слоя вещества, подвергающегося пиролизу: исследуемый раствор наносят на металлические пластинки толщиной 0,2 мм, шириной 5 мм и длиной 20 мм, после чего их высушивают и помещают в индукционное устройство для ввода образца. Покрытие пластинки

благородными металлами может оказаться очень полезным, так как при этом уменьшаются нежелательные побочные эффекты, возникающие при нагревании металлической поверхности.

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

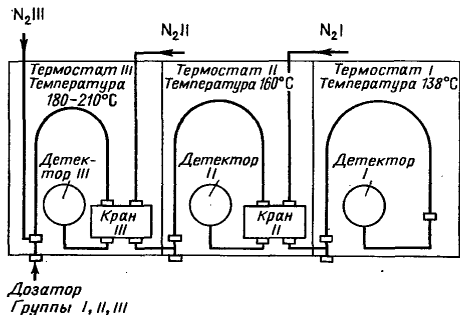
За исключением амидов (Асн и Глн), ГХ-анализом можно обнаружить все природные аминокислоты [35, 121]: Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Сер, Тре, Про, Опр, Фен, Цис, Мет, Асп, Глу, Тир, Лиз, (Орн), Три, Гис, Арг, и Цис-Цис. Как четко продемонстрировано Джонсоном и др. [42], большое число неприродных или редких аминокислот также может легко подвергаться ГХ, однако здесь мы не будем их рассматривать.

Разделение производных аминокислот с помощью ГХ, которое было описано в предыдущих разделах, наталкивается на ряд трудностей, объясняемых несколькими причинами. Как уже упоминалось, раствор природных аминокислот представляет собой сложную смесь соединений различной летучести и полярности. Для этой смеси характерен широкий интервал удерживаемых объемов и необходимы высокие температуры разделения. В некоторых случаях, например для метиловых эфиров ДНФ-аминокислот, ГХ-анализ удастся провести только на коротких колонках с малым количеством жидкой фазы. С другой стороны, наиболее летучие простые аминокислоты представляют собой близкие по структуре (в некоторых случаях изомерные) соединения, и для их разделения необходимы колонки с высокой избирательностью. Положение может еще более осложниться из-за того, что некоторые О-замещенные оксиаминокислоты выходят в тех же интервалах удерживаемых объемов и их пики могут накладываться на пики вышеупомянутых аминокислот. Этим проблемам уделяется особое внимание в работе [19], где показано, что, несмотря на использование более 80 различных жидких фаз, так и не удалось количественно разделить *n*-амиловые эфиры следующих ТФА-аминокислот: Ала, Вал, Гли, Иле, Лей, Сер, Тре. В данном случае неудачное разделение происходит главным образом из-за О-ТФА-производных Сер и Тре. Как многократно наблюдали, производные со свободной ОН-группой имеют большие удерживаемые объемы и не мешают разделению.

Несмотря на упомянутые недостатки, все же образование летучих производных из сложных аминокислот с большим молекулярным весом является определенным доводом в пользу применения этой методики. С другой стороны, этим производным присущи нежелательные для ГХ особенности, например тенденция к образованию «хвостов» и несимметричных пиков. В этой связи следует отметить, что разделение различных ациламино кислот зависит также от эфирных групп. Влияние последних со всей очевидностью про-

демонстрировано сравнительным исследованием [42] *n*-бутиловых, изобутиловых, *n*-амиловых и изоамиловых эфиров ацетиламинокислот. Поэтому можно рассчитывать на то, что при использовании других эфирных групп и для ТФА-аминокислот можно добиться лучшего разделения. Это предположение подтверждено в работе Макисуми и Сарофа [60], которая будет рассмотрена позднее.

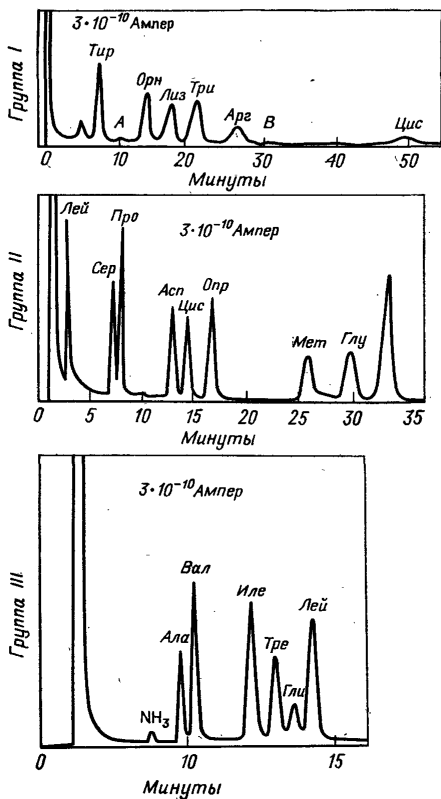
Все природные аминокислоты можно разделить в изотермических условиях только при использовании разных температур, а



Фиг. 72. Схема прибора, на котором проводили исследования Макисуми и Сароф [60].

зачастую и разных колонок [19, 38, 42, 60]. В связи с этим повышаются требования к прибору и увеличивается время анализа, причем для многократного внесения образца необходимы большие количества вещества. Указанные трудности были преодолены искусным комбинированием трех газовых хроматографов [60], работающих при различных температурах с колонками разной длины, в результате чего для полного анализа достаточно однократного внесения образца. Разделение аминокислот проводится в трех параллельных группах. Время всего анализа сводится ко времени проведения анализа группы соединений, движущихся наиболее медленно. Схема прибора представлена на фиг. 72.

Образец метилового эфира ТФА-аминокислоты вводят в прибор III. Краны III и II установлены так, что все три прибора соединяются последовательно. Более летучие производные при высокой температуре (180—210°C) очень быстро проходят через колонку III и поступают на колонку II. После регистрации Фен в детекторе III кран III устанавливают таким образом, что следующие аминокислоты Гис, Тир, Орн, Лиз, Арг и Цис-Цис не переходят на следующую колонку, а регистрируются детектором III.



Фиг. 73. Разделение метиловых эфиров ТФА-аминокислот.

Группа I: 204°C; стальная колонка (длина 0,5 м, диаметр 2,7 мм) содержит 2% неопентилгликосукцината на хромосорбе W; скорость потока N₂ 13,3 мл/мин. Группа II: 161°C; стальная колонка (длина 4,5 м, диаметр 2,7 мм) содержит 2% неопентилгликосукцината на хромосорбе W; скорость потока N₂ 29,8 мл/мин. Группа III: 137°C; та же колонка, что и для группы II; скорость потока N₂ 11,4 мл/мин [60].

Тот же процесс затем происходит на колонке II: и здесь более летучие вещества быстро выходят при температуре колонки 160° С. После регистрации Лей в детекторе II, кран II устанавливают так,

чтобы следующие аминокислоты Сер, Про, Асп, Цис, Опр, Мет, Глу и Фен регистрировались бы на приборе II. Наконец, остающиеся аминокислоты Ала, Вал, Иле, Тре, Гли и Лей полностью разделяют и определяют в приборе I (138° С). Весь анализ перечисленных аминокислот занимает около 30 мин. Пики аминокислот последней группы будут самыми широкими, поскольку эти компоненты были подвергнуты трехкратной хроматографии, однако их тоже можно количественно проанализировать [60]. На фиг. 73 показаны хроматограммы подобного анализа, а его данные представлены в табл. 15.

На одной колонке ТФА-производные природных аминокислот можно разделить только с помощью программирования температуры [16, 38, 131]. Наряду с такими хорошо известными параметрами, как скорость нагрева, поток газа, тип и количество жидкой фазы, важную роль играет и длина колонки [16]. Ее чрезмерное увеличение приводит к худшему разрешению: очевидно, в основе подобных эффектов лежат структурные различия аминокислотных производных. В табл. 15 указаны условия для наилучшего разделения. Как видно из хроматограммы фиг. 74, даже в специально подобранных условиях полное разделение достигается не во всех случаях. Тем не менее такой анализ вполне удовлетворителен для качественного обнаружения аминокислот. Ярким примером эффективности данного метода послужила качественная идентификация всех аминокислот, входящих в состав рибонуклеазы [16].

Насколько нам известно, за исключением эфиров ТФА-аминокислот [16, 27, 38, 131], метиловых эфиров ДНФ-аминокислот [66] и гексафтороксазолидинонов [102], другие производные не пытались разделять с программированием температуры. Тем не менее вполне можно предположить, что с помощью этого метода ГХ любого вещества значительно упрощается и, вероятно, улучшается. Характеристики ГХ-анализа наиболее важных и достаточно подробно описанных методик приведены в табл. 15.

Основное достоинство качественного ГХ-анализа аминокислот состоит в быстром разделении и достоверной идентификации компонентов неизвестной смеси. Однако окончательно идентифицировать органические соединения на одной колонке нельзя — ни по известным относительным удерживаемым объемам, ни по известным стандартным соединениям. Поэтому компоненты необходимо хроматографировать на нескольких колонках различной полярности. Правда, подобрать несколько таких колонок, имеющих удовлетворительную разрешающую способность, довольно трудно. Если задача сводится к обнаружению природных аминокислот, то их можно определить и на одной колонке, но все-таки гораздо лучше фракционировать производные аминокислот на нескольких колонках и характеризовать их величинами относительных удерживаемых объемов. Например, присутствие неизвестной или необычной аминокис-

Газовая хроматография аминокислот

Производное аминокислоты	Растворитель	Внесение образца		Температура, °C	Разделяющая колонка			Носитель, меш	Жидкая фаза, % по весу
		количество ¹ , мкмоль	способ внесения		длина, м	диаметр, см	материал		
ТФА-АК-метиловый эфир	Ацетон	0,02	Испарительная камера	230	0,75 0,75	0,4 0,4	Сталь Сталь	Газохром Р Газохром Р (80—100)	1% НГС ³ 1,5% SE 30 ³
ТФА-АК-метиловый эфир	(CF ₃ CO) ₂ O	0,02	То же	295	0,61	0,3	Сталь	Газохром Р (80—100)	5% НГС
ТФА-АК-метиловый эфир	(CF ₃ CO) ₂ O + этилацетат	0,1	Прямой ввод в колонку	204	0,47 4,57 4,57	0,23 0,23 0,23	Сталь Сталь Сталь	Хромосорб W (60—80)	2% НГС 2% НГС 2% НГС
ТФА-АК-бутиловый эфир	Ацетон	0,4	Испарительная камера	265	2	0,63	Сталь	Газохром А (60—80)	1% НГС
ТФА-АК-бутиловый эфир	CHCl ₃ + (CF ₃ CO) ₂ O	0,2	Прямой ввод в колонку	67	1	0,3	Стекло	Газохром А (60—80)	1% НГС
Ацетил-АК-н-амиловый эфир	Бензол	— ²	Испарительная камера	300	2,44 0,61	0,5 0,5	Сталь Сталь	Хромосорб W (60—80) »	1% карбовакс 1540 0,5% карбовакс 1540
ДНФ-АК-метиловый эфир	Диметоксизтан	— ²	— ²	—	1,8	0,3— 0,5	Стекло	Газохром Р (100—140)	1% SE 30 или 1% QF 1

Производное аминокислоты	Температура, °C	Скорость потока, мл/мин	Газ-носитель	Детектор	Прибор	Детектированные природные аминокислоты	Источник данных
ТФА-АК-метил-эфир	Начало 95°C, линейное программирование 4 град/мин до 225°C	60	N ₂	ПИД (230)	Шимадзу Сейсакушо, мод. GC-1B	Гли, Ала, Вал, Лей, Про, Асп, Глу, Сер, Тре, Мет, Фен, Опр, Лиз, Тир, Три	[38]
ТФА-АК-метил-эфир	Начало 65°C, линейное программирование 1,5 град/мин, через 20 мин—2 град/мин, после 42,5 мин—4,0 град/мин до 200°C, затем постоянная	18	Ag	β-Ионизационный детектор	Джеррел ЭШ, мод. 700	Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Про, Асп, Глу, Сер, Тре, Цис, Мет, Опр, Фен, Тир, Лиз, Орн, Три, Арг, Гис, Цис—S—S—Цис	[16]
ТФА-АК-метил-эфир	204 161 137	13,3 29,8 11,4	N ₂ N ₂ N ₂	ПИД ПИД ПИД	Самодельный	Тир, Орн, Лиз, Три, Арг, Гис, Цис—S—S—Цис, Про, Фен, Сер, Тре, Опр, Асп, Глу, Цис, Мет, Гли, Ала, Вал, Лей, Иле	[60]
ТФА-АК-бутил-эфир	Начало 75°C, через 5 мин—градиент 5,6 град/мин, после 21 мин—7,9 град/мин до 220°C, затем постоянная	128	N ₂	ПИД (250)	F and M, мод. 500/1609	Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Про, Асп, Глу, Сер, Тре, Мет, Фен, Тир, Орн, Лиз, Три, Арг, Гис, Цис—S—S—Цис	[131]
ТФА-АК-бутил-эфир	Начало 67°C, через 6 мин — градиент 3,3 град/мин до 218°C	38	N ₂	ПИД	F and M, мод. 400	Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Про, Асп, Глу, Сер, Тре, Цис, Мет, Опр, Фен, Тир, Лиз, Три, Гис, Цис—S—S—Цис	[27]
Ацетил-АК-н-амиловый эфир	Постоянная 125°C, через 23 мин поднимают до 148°C	60 240	Ag Ag	β-Ионизационный детектор	Барбер Колман, мод. 10	Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Про, Асп, Сер, Тре, Цис, Мет, Опр, Фен, Асп, Глу, Мет, Опр, Тир, Лиз	[42]
ДНФ-АК-метил-эфир	175 202	— —	Ag Ag	β-Ионизационный детектор	— ² — ²	Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Про, Асп, Глу, Мет, Фен	[66]

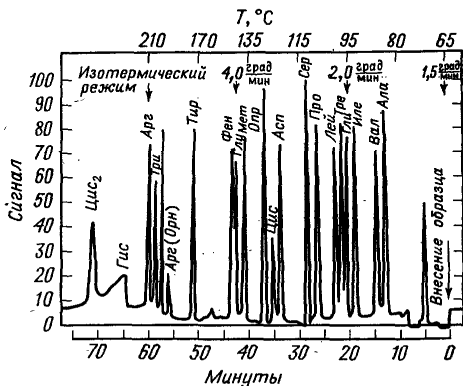
¹ Количество каждой внесенной аминокислоты.

² Не указано.

³ Соединялись две колонки (HGC + SE 30).

Используемые сокращения: HGC — неопентилгликосукцинат, SE 30 — силиконовый каучук SE 30. QF 1 — фторсиликоновый каучук QF 1. ПИД — пламенно-ионизационный детектор.

лоты можно установить однозначно только при сравнении результатов, полученных на разных колонках. Недостаток надежных данных об относительных удерживаемых объемах и соответствующих температурах удерживания для производных аминокислот препятствует более широкому применению ГХ в этой области. Было бы желательно выбрать для подобных измерений стандартное соединение; эту роль



Фиг. 74. Разделение метиловых эфиров ТФА-аминокислот [16].

Стальная колонка (длина 0,6 м, внутренний диаметр 1,5 мм) содержит 5% неопентилгликоусульфата на газохроме Р (80—100 меш); скорость потока Ar 18 мл/мин. Начало разделения при 65°C; линейное программирование температуры с градиентом 1,5 град/мин, через 20 мин — 2,0 град/мин, через 42,4 мин — 4 град/мин вплоть до 200°C, после чего режим делают изотермическим.

могло бы играть соответствующее производное неприродной аминокислоты, например норлейцина. Правда, из-за весьма заметных различий между аминокислотными производными сравнения с единственным стандартом вряд ли достаточно. По вышеупомянутым причинам в этом обзоре мы не приводим величин удерживаемых объемов различных производных аминокислот.

Исследуя различные производные одного и того же соединения, можно убедительно идентифицировать аминокислоты методом ГХ. Если учесть большое влияние N-защитных групп на хроматографическое поведение аминокислот, из сравнения, например, ТФА-, ацетил- и ДНФ-соединений с различными эфирами N-ацил-производных можно извлечь очень интересную информацию [64]. Следует отметить также, что после разделения компоненты можно собрать и подвергнуть анализу с помощью других методов. Складывается впечатление, что из-за необходимости полу-

чать производные и, следовательно, сравнительно больших затрат вещества, другие методы, используемые в этой области, обладают преимуществами перед ГХ. Однако указанные недостатки компенсируются тем, что сложные процедуры разделения и идентификации, которые были бы очень дорогостоящими в случае применения других методов, можно выполнить с помощью ГХ за короткое время и с высокой надежностью, причем все это относится и к аминокислотам-стереоизомерам. Как указывалось при рассмотрении гексафтороксазолидинонов, Иле и *алло*-Иле можно быстро и количественно разделить в 50-метровом стальном капилляре с полифениловым эфиром OS 138 (Perkin-Elmer) при 80° С. Джонсон и др. [42] описали аналогичное разделение Тре и *алло*-Тре в виде N-ацетил-*n*-бутиловых эфиров на колонке длиной 244 см, содержащей 5% карбовакса 1540 на хромосорбе W (60—80 меш) при 146° С. Этот метод с успехом применен для установления структуры циклодепептида [80]. Описано также разделение аминокислот в форме N-ТФА-*n*-бутиловых эфиров на капилляре с апиезоном L [93].

ПРОБЛЕМЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТ

Количественный анализ аминокислот методом ГХ представляет несомненный интерес. Как правило, количественное определение аминокислотного состава пептида является одним из решающих моментов анализа последовательности. Поскольку при деградации крупного белка образуется большое число фрагментов, желательно затрачивать на анализ каждого из них минимальное количество времени и вещества. Привлечение в данном случае ГХ достаточно хорошо удовлетворяет этим условиям. Многочисленные исследования по ГХ аминокислот в конечном итоге направлены на решение этой задачи. Однако к действительно эффективному количественному методу предъявляются несоизмеримо более высокие требования, чем к качественному. Если учесть к тому же трудности получения и разделения производных аминокислот, станет ясно, почему до сих пор не разработан стандартный метод их количественного определения с помощью газового хроматографа. Основные трудности связаны, как подчеркивалось в разделе о получении производных, с полифункциональными аминокислотами. Метод, игнорирующий их идентификацию, может найти лишь ограниченное применение. Количественный анализ только простых аминокислот не может удовлетворять экспериментатора [40]. Вопрос о том, все ли аминокислоты, встречающиеся в белках, можно определять ГХ с достаточной точностью, все еще остается открытым. Здесь можно только вкратце рассмотреть имеющиеся условия и возможности. Проблемы, связанные с аппаратурой, необходимой для количественной ГХ, уже обсуждались ранее (см. стр. 302).

Целью количественного аминокислотного анализа является определение молярного состава пептида, т. е. типа и количества входящих в него аминокислот. Выражение молярных отношений аминокислот путем сопоставления содержания данной аминокислоты с соответствующим значением аминокислоты, присутствующей в смеси в наименьшем количестве, хотя и дает верную картину общего состава исходного соединения, не позволяет получить информации о размере, т. е. длине полипептидной цепи. Для этого нужно определить количество хотя бы одной из аминокислот и отнести его к количеству взятого пептида. Естественно, такое определение имеет смысл только при условии, что все аминокислоты, составляющие пептид, обнаруживаются с одинаковой точностью. В таком случае можно работать с одним или несколькими внутренними стандартами, имеющими подходящие удерживаемые объемы, и находить индивидуальные поправочные коэффициенты, специфичные для определяемых производных аминокислот и, как уже упоминалось, в сильной степени зависящие от типа детектора [45, 48].

Пики, получаемые в так называемых специфичных детекторах, не отражают структурных отличий компонентов. Эти детекторы реагируют только на одну группу, присутствующую во всех производных. При регистрации метиловых эфиров ДНФ-аминокислот электронозахватным детектором наблюдали лишь очень небольшие зависящие от структуры изменения сигнала [54]. Этот детектор специфически реагирует на ДНФ-группу аминокислотных производных. Другой метод измерения, доступный лишь в исключительных случаях, основан на общем превращении различных аминокислот в одно соединение, например метан [3].

Для количественного определения аминокислот в отличие от обычной количественной ГХ важно парциальное содержание в смеси не аминокислотного производного, а исходной аминокислоты. Ошибки всех операций, проводимых перед разделением и идентификацией, оказываются включенными в общую ошибку конечного аналитического результата. Поэтому превращение аминокислот должно быть количественным или по крайней мере количественно воспроизводимым. Большие различия в выходах, даже если они воспроизводимы, заведомо усложняют работу и делают ее чрезвычайно трудоемкой. Как показано при исследовании образования бутиловых эфиров ТФА-аминокислот, средние выходы для определенных аминокислот почти не отличались друг от друга и составляли около 96% [16, 53]. Однако при получении летучих ТФА-метиловых эфиров Ала, Гли и Вал происходили значительные потери вещества даже при аккуратном концентрировании образцов [19, 53]. Если для аминокислотного анализа выбраны производные с высокой летучестью, подобных операций лучше избегать.

Естественно, большое влияние на результаты анализа оказывает способ хранения и внесения образца. В связи с тем, что не-

которые аминокислоты чувствительны к гидролизу, необходимы особые предосторожности [19, 53]. Однако прежде всего для анализа смесей аминокислот требуются унифицированные экспериментальные условия превращения аминокислот. Судя по бросающимся в глаза противоречиям в опубликованных данных, эта проблема еще не решена.

Воспроизводимость пиков на газовой хроматограмме определяется поведением компонентов на колонке. Несомненно, что именно здесь кроется одна из самых серьезных проблем количественной ГХ. Как известно, частичное разложение и явления адсорбции (образование «хвостов») в определенной степени мешали анализу многих полифункциональных органических соединений [36]. Об аналогичных наблюдениях, касающихся производных аминокислот, мы уже упоминали [19, 53, 78]; измерения Крукшенка и Шиэна [16] также не дали удовлетворительных результатов. Для всех 20 проанализированных аминокислот, за исключением Гис и Цис, разброс по величине пиков составлял менее 10%. Однако лишь для 10 аминокислот эти величины были менее 5%. При аналогичных измерениях Ламкин и Герке [53] получили значительно лучшие результаты, но они исследовали меньшее число аминокислот и провели меньше экспериментов. Следует отметить несомненное преимущество прямого внесения образца на колонку, использованного этими авторами. Впоследствии Шталлинг и др. [83] описали количественный ГХ-анализ всех природных аминокислот.

Наконец, следует подчеркнуть, что как для количественного превращения и разделения аминокислот, так и для хорошей воспроизводимости сигналов с достаточной точностью необходима в первую очередь соответствующая калибровка. При этом площади пиков можно было бы непосредственно и надежно сопоставлять с количеством микромолей аминокислот. О ценности методики можно судить только после ее применения для анализа подходящего пептидного гидролизата и сравнения с результатами, полученными другими методами.

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПЕПТИДОВ

Разделение и идентификация смеси коротких пептидов, которые могут получаться при частичном кислотном или щелочном гидролизе, а также при неспецифическом ферментативном расщеплении полипептидов и подобных больших молекул, все еще представляют собой довольно трудные задачи, требующие для своего решения сложного оборудования и больших затрат времени. ГХ таких смесей может значительно упростить процедуру, хотя проблема идентификации остается нерешенной. В сущности преимущество ГХ состоит в том, что разделенные соединения можно регистрировать при низких концентрациях, выделять свободными от различных

примесей (буферы и др.), а затем подвергать дальнейшим исследованиям.

При разделении пептидов с помощью ГХ возникает ряд проблем, связанных с обилием возможных соединений. Даже разделение природных аминокислот, число которых невелико — довольно трудная задача. Комбинация 18 аминокислот в дипептиды дает $18^2=324$ различных соединения; комбинация в трипептиды приводит уже к 5832 (18^3) разным компонентам. С ростом длины цепи экспоненциально возрастает число соединений.

Полярность этих веществ также возрастает при удлинении цепи. Соответственно температура при ГХ пептидов должна быть выше, и это сильно ограничивает выбор жидких фаз. Даже если предположить, что с ростом длины цепи число выявляемых компонентов существенно уменьшается, оно все же остается настолько большим, что даже эффективности ГХ и родственных ей методов оказывается недостаточно: исследователю приходится мириться с неудовлетворительным разделением и наложением пиков пептидов. Подобные явления будут более заметны для сходных по структуре веществ и соединений, имеющих большое число возможных изомеров. Это означает, что как раз для наиболее длинных фрагментов, которые, естественно, дают большую информацию об исходной последовательности, разделение будет хуже.

В случае применения подобной методики для анализа последовательности аминокислот необходима идентификация разделенных соединений, однако возможности ГХ в данном случае довольно ограничены. Кроме того, что необходимы колонки различной избирательности, нужно знать и относительные удерживаемые объемы исследуемых соединений. Идентификация непосредственно зависит также от доступности подходящего стандарта. Если дипептиды можно синтезировать химически, то для более длинных пептидов это очень трудная задача. Применение ГХ только в целях разделения оправдано лишь тогда, когда выделенные пептидные производные можно уверенно идентифицировать и определить их последовательность с помощью других методов.

Отсюда вытекает несколько следствий. Необходимо, чтобы после разделения компоненты были выделены или каким-то образом стали доступны для последующей идентификации. Поэтому при детектировании на газовом хроматографе вещество не должно разрушаться: для этого либо используют подходящие, обычно менее чувствительные детекторы, либо разделяют смесь газа-носителя с образцом после выхода с колонки так, что только часть смеси анализируется в высокочувствительном детекторе. Технически эти требования вполне выполнимы.

Малые количества вещества, которые могут быть получены в результате аналитической ГХ, идентифицировать очень трудно. Вместе с тем использование больших количеств вещества при вне-

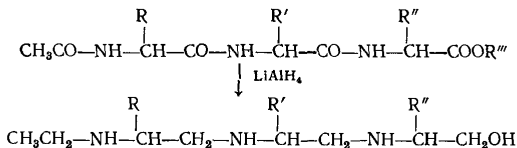
сении проб не только лишило бы метод одного из главнейших его достоинств, но могло бы неблагоприятно повлиять на разделяющую способность колонки, поэтому в свете рассмотренных выше проблем разделения этого следует всячески избегать. Следовательно, обычные методы деградации, применяемые для анализа последовательности аминокислот, в данном случае не пригодны.

Как показано многочисленными исследованиями, убедительную идентификацию производных пептидов можно провести с помощью масс-спектрометрии [34, 85, 123]. Комбинация этих двух методов может значительно облегчить анализ последовательности пептидов — к тому же для обоих методов требуются очень малые количества вещества. Газовая хроматография пептидов изучалась только в двух лабораториях, в которых были предложены различные методики получения их производных. Для последующей идентификации крайне важно, чтобы структуру исходных соединений можно было узнавать по их производным. Хотя детальное рассмотрение масс-спектрометрии выходит за рамки рассматриваемого ниже процесса ГХ пептидов, многие операции, которые будут описаны, должны рассматриваться с учетом возможного использования масс-спектрометрического метода. Соединение капиллярной или набивной колонки непосредственно с масс-спектрометром дает возможность измерять полный масс-спектр каждого пика и, таким образом, с помощью этого способа получать необходимую информацию.

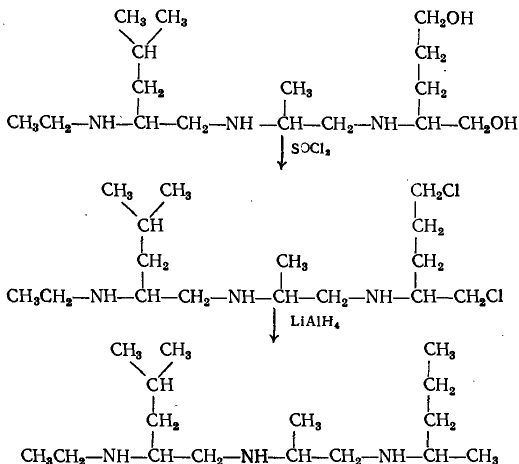
Наряду с простым отбором фракций в капилляры на выходе газового хроматографа и переносом их в масс-спектрометр существуют различные способы соединения этих двух приборов [13, 20, 33, 75, 97].

МЕТОД БИМАНА И ДР. [6, 7]

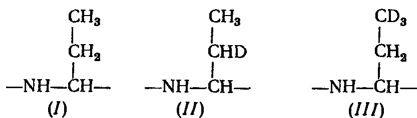
На основании работ Янгса [129] по ГХ эфиров N-ацетиламинокислот следовало ожидать, что разделение соответствующих производных пептидов возможно лишь в исключительных случаях. Исследования в этом направлении были проведены Эвансом [25]. Биман и др. [6] изучали полиаминоспирты, образующиеся из эфиров N-ацетилпептидов при восстановлении LiAlH_4 ; их получение ранее было описано Карпером и Николаусом [50]:



Эти соединения настолько летучи, что даже три- и тетрапептиды можно подвергать ГХ. Летучесть существенно снижается, если в исходной молекуле присутствуют оксигруппы или они образуются при восстановлении. Поскольку из-за больших удерживаемых объемов и образования «хвостов» разделение оказалось неудовлетворительным, было предложено [7] элиминировать оксигруппы путем замещения их на хлор и последующего восстановления:



Получающиеся в результате этих реакций полиамины имели при разделении в газовом хроматографе заметно меньшие удерживаемые объемы и давали более острые пики. С помощью масс-спектрометрии все изучаемые пептиды можно было идентифицировать в виде как полиаминоспиртов, так и полиаминов. Определенные аминокислоты в ходе двукратного восстановления теряют некоторые структурные особенности, а образующиеся из них продукты дают при масс-спектрометрии пики с одинаковым числом единиц массы и, следовательно, становятся неразличимыми. К ним относятся Ала и Сер, Вал и Глу, Про и Опр, а также α -аминомасляная кислота, Тре и Асп. В таких случаях их можно различить на масс-спектре, если восстановление вести в присутствии LiAlD_4 , когда восстанавливаемые группы метятся одним или несколькими атомами дейтерия [7]. Проиллюстрируем это на примере трех последних аминокислот: при двукратном восстановлении боковая цепь α -аминомасляной кислоты (I) остается неизменной, в Тре (II) включается один атом дейтерия и в Асп (III) — три:



Благодаря отличиям в массах соответствующих фрагментов можно различить все три аминокислоты. К сожалению, этот довольно изящный метод имеет недостатки, из-за чего область его применения ограничена. Наиболее серьезный недостаток состоит в том, что побочные продукты, которые могут образоваться при неполном восстановлении, невозможно выделить. Когда имеют дело со смесью пептидов неизвестного состава, трудно отличить истинное производное от побочного продукта, так как последний также может детектироваться в газовом хроматографе. Еще одна побочная реакция в результате разрывов пептидных связей при восстановлении может привести к появлению новых соединений (свободных аминов и альдегидов), которые еще более усложняют картину. Известно, что при восстановлении третичного амида с помощью LiAlH_4 происходит расщепление амидной связи и образуются альдегиды и амины [104]. Подобные реакции расщепления уже наблюдали для пролиновых пептидов [74]. Они встречаются также в ходе восстановления пептидов другими гидридами металлов [63]. Мы вынуждены признать, что этот метод может применяться только для не слишком сложных смесей нескольких простых аминокислот. Но даже при таком ограничении его важным преимуществом является то, что для анализа требуется очень небольшое количество вещества (несколько миллиграммов).

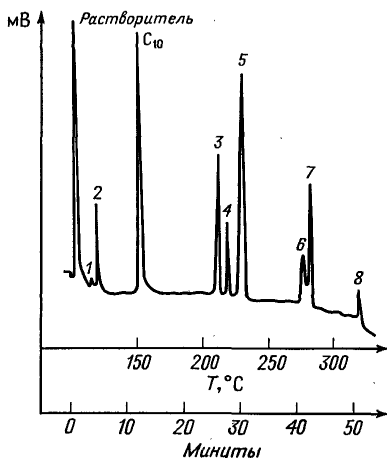
МЕТОД ВЕЙГАНДА И ДР. [68, 113—115, 120, 121, 123]

В данном методе в отличие от рассмотренных выше пептиды сначала защищают и затем, за некоторыми исключениями, непосредственно подвергают ГХ. Аминогруппы защищают остатком ТФА, а карбоксильную группу блокируют в процессе этерификации метанолом. На летучесть ТФА-соединений уже неоднократно указывалось; с помощью возгонки в высоком вакууме было достигнуто разделение соответствующих производных аминокислот, ди-, три- и более крупных пептидов [107].

Для ГХ этих соединений нужно было прежде всего решить проблемы, связанные с термостабильностью колонок и подобрать метод разделения. Из-за более высокой, чем у аминокислот, полярности для пептидов требуется, как правило, температура более 200°C . Не касаясь вопроса о стабильности фаз, отметим, что применение в данном случае полярных жидких фаз, например реоплекса или полифенилового эфира, довольно ограничено. Для

сравнительно простых дипептидов их использование дало хорошие результаты, но если учесть, что при этом число разделяемых соединений было мало, вряд ли можно надеяться на более широкое применение этой методики в аналитических работах по установлению последовательности аминокислот. Удовлетворительными разделяющими фазами оказались неполярные силиконовые каучуки SE 30 и SE 52; менее выгоден апиезон L.

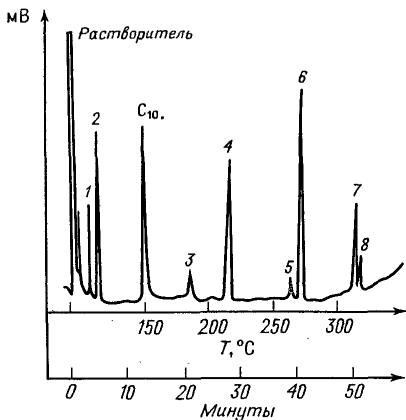
При использовании подобного метода разделения для анализа последовательности аминокислот избирательность разделяющих



Фиг. 75. Газовая хроматограмма частичного гидролизата Лей-Лей-Вал-Вал после этерификации и трифторацетилирования.

Колонка длиной 1,8 м с 20% SE 30 на диатопорте W скорость потока He 62 мл/мин. Сначала режим изометрический (150°C); после выхода C₁₀ — метилового эфира каприновой кислоты — линейное программирование температуры с градиентом 5 град/мин. 1 — Вал; 2 — Лей; 3 — Вал-Вал; 4 — Лей-Вал; 5 — Лей-Лей; 6 — Лей-Вал-Вал; 7 — Лей-Лей-Вал; 8 — Лей-Лей-Вал-Вал.

фаз не играет большой роли, если анализируют не очень большое число соединений; решающим в данном случае будет число компонентов, детектируемых на одной колонке. Так как тетрапептиды можно обнаружить в газовом хроматографе только в исключительных случаях, наибольшее внимание неизбежно сосредоточивается на наиболее полной идентификации ди- и трипептидов. В соответствующих работах показано, что ее можно осуществить только с вышеупомянутыми фазами.



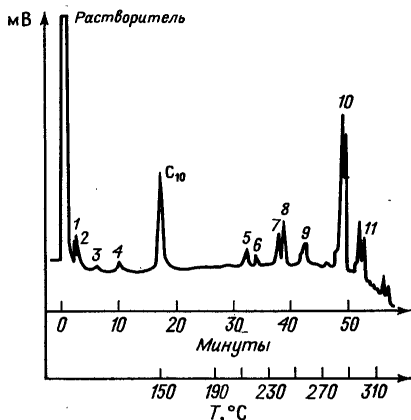
Фиг. 76. Газовая хроматограмма частичного кислотного гидролизата Лей-Фен-Вал-Вал после этерификации и трифторацетилирования.

Колонка длиной 1,8 м с 20% SE 30 на диатопорте W; скорость потока He 62 мл/мин. Сначала режим изотермический (150°C); после выхода C_{10} — метилового эфира каприновой кислоты — линейное программирование температуры с градиентом 5 град/мин. 1 — Вал; 2 — Лей; 3 — Фен; 4 — Вал-Вал; 5 — Фен-Вал; 6 — Лей-Фен; 7 — Фен-Вал-Вал; 8 — Лей-Фен-Вал.

Как уже отмечалось, поскольку в смеси находится большое число различных соединений, не приходится рассчитывать на полное разделение компонентов, тем более, что разделяющие фазы обладают относительно слабой избирательностью. В связи с этим целесообразно анализировать не слишком длинные пептиды после проведения их частичного гидролиза. Например, при расщеплении декапептида в наиболее благоприятных условиях получается 9 дипептидов, 8 трипептидов и т. д. Если данный пептид состоит из 10 различных аминокислот, которые все детектируются при ГХ, тогда необходимо разделить смесь, состоящую из 27 соединений, не считая тетрапептидов, которые, вероятно, тоже могут быть обнаружены. Все возможные короткие фрагменты, разумеется, идентифицировать довольно трудно. Указанная область размеров длины цепи (от аминокислоты до тетрапептида) является, несомненно, предельной для возможностей этого метода.

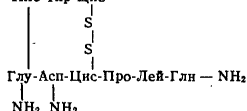
Неудовлетворительное разделение, однако, пытаются компенсировать с помощью масс-спектрометрии. Было показано, что на масс-спектрометре полностью идентифицируются смеси простых пептидов [123], причем наложение пиков ни в коей мере не исключает идентификации пептидных производных.

Вполне понятно, что у пептидов различия в полярности и летучести больше, чем у аминокислот. Пептиды элюируются в гораздо более широком интервале удерживаемых объемов и изотермически можно разделить лишь очень небольшую часть гидролизата. При выборе подходящих колонок и условий реакции можно было бы



Фиг. 77. Газовая хроматограмма частичного кислотного гидролизата окситоцина после десульфирования и триметилсилилирования.

Окситоцин имеет строение

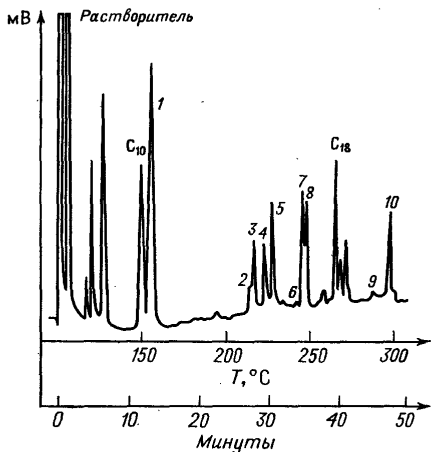


Колонка длиной 1,8 м с 10% SE 30 на диатопорте Р; скорость потока He 62 мл/мин. Сначала режим изотермический (150°C); после выхода C₁₀ — метилового эфира каприновой кислоты (стандарт) — линейное программирование температуры с градиентом 5 град/мин. 1 — Ала; 2 — Гли; 3 — Лей; 4 — Асп; 5 — Лей-Гли; 6 — Ала-Про; 7 — Тир; 8 — Про-Лей; 9 — Иле-Глу; (?) Глу-Асп; 10 — Ала-Тир; 11 — Тир-Иле.

получить хорошее разделение и в этой части гидролизата — естественно, с относительно большими затратами (и потерями) вещества. При такой методике большая часть взятого на анализ гидролизата неизбежно теряется из-за плохого разделения (с более летучими компонентами) или неудовлетворительного элюирования (с менее летучими веществами). А так как закономерности выделения и очистки больших пептидов еще недостаточно изучены, следует избегать любых потерь. Разделение частичного гидролизата лучше

проводить в одном аналитическом опыте, тогда при нанесении одинаковых количеств вещества гораздо проще проводить повторный анализ всей смеси в процессе многостадийного изотермического исследования, а компоненты смеси при этом можно надежно идентифицировать с помощью подходящего контроля.

При использовании режима с программированием температуры подобные смеси легко разделяются в одном аналитическом

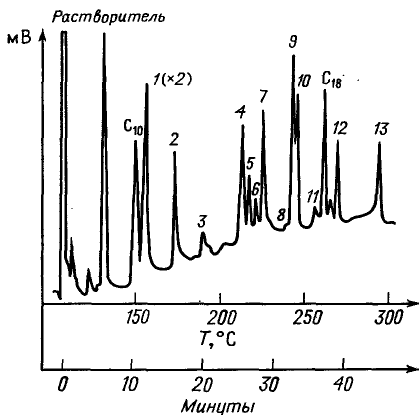


Фиг. 78. Газовая хроматограмма частичного кислотного гидролизата А-цепи инсулина после этерификации и трифторацетилирования.

Колонка длиной 1,8 м с 10% SE 30 на диатопорте Р; скорость потока He 66 мл/мин. Сначала режим изотермический (150°C); после выхода C₁₀ — метилового эфира каприновой кислоты — линейное программирование температуры с градиентом 5 град/мин. 1 — Глу; 2 — Сер-Вал; 3 — Иле-Вал; 4 — Сер-Лей; 5 — Тир; 6 — Вал-Глу; 7 — Глу-Лей; 8 — Лей-Глу; 9 — Лей-Тир; 10 — Глу-Глу; C₁₈ — метиловый эфир стеариновой кислоты (стандарт).

опыте, как видно из хроматограмм, представленных на фиг. 75—80. Отдельные группы соединений — аминокислоты, ди-, три- и тетрапептиды — выходят в различных температурных интервалах, что позволяет, несмотря на некоторое перекрывание (например, аминокислоты с большим молекулярным весом начинают выходить вместе с дипептидами), обнаруживать по виду хроматограмм качественные различия, характерные для разных последовательностей, подобно методу «отпечатков пальцев» [39]. Чтобы применять ГХ для определения последовательности, необходимо знать, какие комбинации

аминокислот в ди-, три- и более длинных пептидах можно детектировать. В связи с тем что число таких сочетаний очень велико, а задача синтеза пептидов, особенно длинных, достаточно сложна, не приходится рассчитывать на получение исчерпывающих данных. Для идентификации три- и тетрапептидов выбор стандартных образ-



Фиг. 79. Газовая хроматограмма частичного кислотного гидролизата А-цепи инсулина после этерификации, трифторацетилирования и десульфирования.

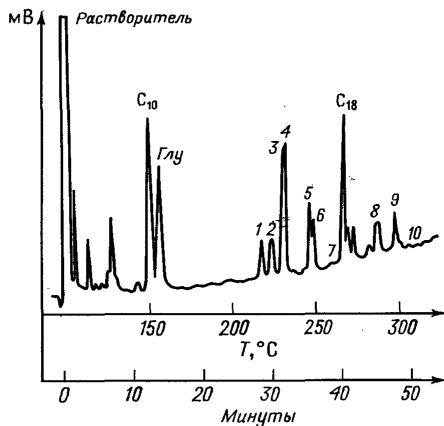
Разделение проводили на приборе, схема которого представлена на фиг. 72. C₁₀ — метиловый эфир каприновой кислоты; 1 — Глу; 2 — Ала-Ала; 3 — Вал-Ала; 4 — Сер-Вал+Иле-Вал; 5 — Ала-Асп; 6 — Сер-Лей; 7 — Тир+Глу-Ала; 8 — Вал-Глу; 9 — Глу-Лей; 10 — Лей-Глу; 11 — Глу-Асп; 12 — Тир-Ала; 13 — Глу-Глу; C₁₈ — метиловый эфир стеариновой кислоты.

цов особенно труден. Однако поведение самих аминокислот в процессе ГХ может дать существенную информацию, что позволяет избежать бесполезных экспериментов.

Превращение пептидов в N-ТФА-метиловые эфиры происходит совершенно аналогично аминокислотам: сначала их переводят в хлоргидраты метиловых эфиров, а затем трифторацетилируют. Если индивидуальные вещества не собираются определять количественно (в связи с тем, что расщепление различных пептидных связей зависит и от метода деградации, и от самой последовательности), то желательно исчерпывающее превращение, так как при этом образуется меньше продуктов расщепления. В ходе этерификации следует соблюдать предосторожности, особенно при работе с ферментативным гидролизатом, чтобы предотвратить дополнительное расщепление лабильных связей под действием кисло-

ты. 24-часовая инкубация в 0,1 н. метанольном растворе HCl при комнатной температуре удовлетворяет необходимым условиям [15].

Трифторацетилирование избытком метилового эфира трифторуксусной кислоты в абсолютном метаноле при комнатной темпе-



Фиг. 80. Газовая хроматограмма частичного кислотного гидролизата А-цепи инсулина после этерификации, трифторацетилирования и триметилсилилирования.

Разделение проводили на приборе, схема которого представлена на фиг. 72. C₁₀ — метиловый эфир каприновой кислоты; 1 — Иле-Вал; 2 — Сер-Вал; 3 — Тир; 4 — Сер-Лей, (?) Вал-Глу; 5 — Глу-Лей; 6 — Лей-Глу; 7 — Глу-Асп (?); 8 — Лей-Тир; 9 — Глу-Глу; 10 — Тир-Глу; C₁₈ — метиловый эфир стеариновой кислоты.

ратуре с добавлением триэтиламина приводило к различным выходам при превращениях аминокислот [109]. Риск образования дикетопиперазинов, характерного для эфиров дипептидов, можно уменьшить при добавлении большого избытка ацилирующего агента [119]. Дикетопиперазины тоже можно подвергать газовой хроматографии, но они дают сильно асимметричные пики и поэтому непригодны для анализа последовательности [121]. Трифторацетилирование хлоргидратов пептидов можно проводить также в реакции с трифторуксусным ангидридом [119]. Хотя при этом существует опасность дополнительного расщепления пептидных связей, соответствующие продукты образуются с таким низким выходом, что это не может повлиять на последующий анализ [111]. При комнатной температуре ацилирование ангидридом протекает быстрее и более полно. Как и в методе Бимана, эфиры N-ТФА-пептидов хорошо отделяются от непрореагировавшей части молекул экстракцией

кислотой и водой. При такой процедуре гидролизуются О-ТФА-производные, образовавшиеся в ходе реакции с ангидридом. Полученную смесь защищенных пептидов вносят в подходящий растворитель, например тетрагидрофуран, этилацетат или метанол, и подвергают фракционированию.

ГХ ди-, три-, и, возможно, многих тетрапептидов, состоящих из аминокислот Ала, Вал, Лей, Иле и Про, не вызывает никаких затруднений. Поскольку у Гли нет боковой цепи, пики соответствующих дипептидов часто имеют «хвосты». Это явление, вероятно, вызвано эффектами адсорбции; ими же, по-видимому, объясняется неполное элюирование N-ТФА-Гли-Гли-Гли-ОСН₃ [19]. С Мет были исследованы только дипептиды, а с Фен — также и трипептиды. Хотя, как следует из поведения N-ТФА-Ала-Фен-Фен-ОСН₃, трипептиды, состоящие из аминокислот с высоким молекулярным весом, элюируются не всегда, при использовании коротких колонок с малым количеством жидкой фазы можно получить удовлетворительные результаты.

Что касается полифункциональных аминокислот, то дипептиды, содержащие Глу, Лиз и Орн, не представляют трудностей ни для получения производных, ни для хроматографии. Дополнительные функциональные группы защищают в ходе обычного получения производных. Однако у дипептидов, содержащих Лиз и Орн, в результате адсорбции наблюдается сильное размывание пиков на колонках, содержащих менее 5% жидкой фазы [122]. Изомерные α- и β-пептиды, содержащие Глу, при ГХ разделяются [114, 121]. В аналогичных исследованиях метиловых эфиров N-ТФА-производных пептидов, содержащих Асп, при нагревании обнаружено образование циклических имидов, зависящее от температуры системы и более заметное для β-пептида [106]. Отделить имиды от соответствующих α-пептидов можно только на капиллярных колонках. Возможно, при прямом внесении образца в колонку подобных реакций удалось бы избежать. Трипептиды, в которые входят указанные выше аминокислоты, до сих пор не исследованы.

Сер и Тре из-за термического β-элиминирования во время внесения образца при высокой температуре могут давать несколько сигналов. Наилучшим методом защиты этих аминокислот оказалось триметилсилилирование гексаметилдисилазаном [121]. Тирозинсодержащие дипептиды в результате О-триметилсилилирования дают острые симметричные пики. Эти соединения могут быть приготовлены при нагревании в течение 30 мин в избытке гексаметилдисилазана после этерификации и трифторацетилирования.

До сих пор не удалось обнаружить дипептиды, содержащие Цис и Цис₂. Цис особенно склонен к β-элиминированию, на что уже указывалось в разделе об аминокислотах. Из-за отсутствия подходящих S-защитных групп были вынуждены прибегнуть к десульфированию на никеле Ренея [121]. Согласно этому методу, эфиры за-

щищенных пептидов десульфироваться на никеле Ренея в процессе продолжительного нагревания в 90%-ном водном метаноле. В результате из цистеиновых и цистиновых соединений образуются соответствующие аланиновые пептиды, которые можно отличить от аланиновых пептидов, имеющих в исходной молекуле, с помощью D_2O . Аналогично методике Бимана, SH-группа замещается на дейтерий, что обеспечивает идентификацию компонентов в масс-спектрометре. Одновременно с Цис десульфироваться метиониновые соединения — они превращаются в пептиды α -аминомасляной кислоты, которые легко детектируются в газовом хроматографе.

Соединения с Арг, Гис и Три до сих пор исследованы очень мало. Сложные дипептиды, содержащие эти аминокислоты, вряд ли можно детектировать. Для Арг существует возможность его превращения в Орн с помощью аргиназы [30]. Это может оказаться полезным, так как после триптического гидролиза больших пептидов благодаря его специфичности часть остатков Арг будет находиться в С-концевом положении фрагментов. При обработке этих пептидов аргиназой соответствующие С-концевые аминокислотные остатки превращаются в Орн, что делает пептиды доступными для ГХ. После частичного кислотного гидролиза пептиды, содержащие Три, практически не образуются, поскольку во время этой процедуры происходит разрушение Три.

Последовательность стадий вышеописанного анализа можно схематически суммировать следующим образом: 1) частичный гидролиз, 2) этерификация, 3) трифторацетилирование \rightarrow ГХ-анализ, 4) десульфирование \rightarrow ГХ-анализ, 5) триметилсилилирование \rightarrow ГХ-анализ.

Из сравнения результатов трех ГХ-анализов можно очень точно определить положение пептидов, содержащих оксиаминокислоты, Цис и Цис₂. После десульфирования одни пики исчезают, а другие появляются — они принадлежат серусодержащим пептидам. Если в исходном образце Мет отсутствует, то это должны быть цистеиновые (цистиновые) пептиды, которые таким образом легко идентифицируются. Та же ситуация наблюдается при количественном триметилсилилировании; при этом выявляются соединения, содержащие Сер, Тре, Опр и Тир. Производные дипептидов, содержащих Опр и Тир, элюируются при относительно высоких температурах. Таким образом, к определенным выводам можно придти даже на основании интервала удерживаемых объемов.

В заключение можно сказать, что с помощью ГХ можно идентифицировать в виде дипептидов большинство природных аминокислот. Возможность детектирования многих аминокислот даже в виде трипептидов, а в исключительных случаях и тетрапептидов, дает в руки исследователя быстрый и относительно несложный метод определения последовательности олигопептидов средней длины. ГХ применяется сейчас в основном как быстрый и эффективный метод разделения. Более полное использование достоинств ГХ до-

стигается при комбинировании с масс-спектрометрией [68, 106]; оно уже было с успехом применено для анализа смесей жирных кислот [75]. Весьма обещающим является использование специально сконструированных ионных источников, в результате чего становится излишним присоединение к газовому хроматографу детектора [13].

Фиг. 75—80 иллюстрируют характер ГХ N-ТФА-метиловых эфиров пептидов различной длины, которые были подвергнуты частичному кислотному гидролизу или метанолизу.

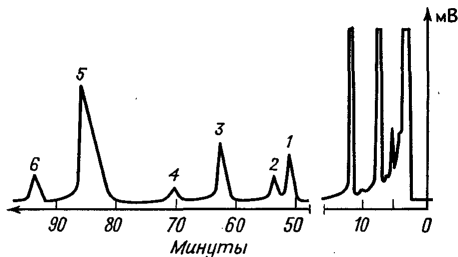
Как показано на фиг. 75 и 76, если анализируют тетрапептид, можно обнаружить все возможные фрагменты. В одном случае удается даже идентифицировать исходный пептид. На фиг. 77 представлена хроматограмма частичного гидролизата окситоцина, который в соответствии с вышеприведенной схемой десульфировали и триметилсилилировали. Были идентифицированы все возможные дипептиды, в том числе и соединения, содержащие Асп, которые образовывались при расщеплении лишь в небольшом количестве. Сравнивая различные газовые хроматограммы, можно сделать заключение о присутствии последовательностей, содержащих Цис (или Цис₂) и оксиаминокислоты. На фиг. 78, 79 и 80 представлены газовые хроматограммы частичного гидролизата А-цепи инсулина, полученные на разных стадиях рассмотренных ранее превращений. После десульфирования, как видно из сравнения фиг. 78 и 79, появляются новые сигналы 2, 3 и 5, тогда как пики 7 и 12 становятся более широкими. Во всех этих случаях образуются соединения с Ала. Аналогичным образом после триметилсилилирования находят на фиг. 80 новые пики 2, 3, 4, 8 и 10, а сигналы 2, 4, 5 и 8, имеющиеся на фиг. 78, — исчезают. Эти пики соответствуют пептидам А-цепи, содержащим Сер и Тре, причем последние элюируются при относительно высоких температурах удерживания. После силилирования пики выходят при более высоких температурах элюирования. Как и в случае других пептидов, после кислотной деградации можно было обнаружить все ожидаемые дипептиды, за исключением дипептидов, содержащих Асп. Неидентифицированные пики, возможно, принадлежат трипептидам.

На всех рассмотренных хроматограммах компоненты идентифицировали с помощью стандартов, поскольку не было возможности для проведения масс-спектрометрического анализа.

Получаемая методом ГХ информация об исходной пептидной цепи, особенно для такой относительно большой молекулы, как А-цепь инсулина, не достаточна для определения полной последовательности. Для этого дополнительно должны быть привлечены различные методики расщепления. Тем не менее совершенно очевидно, что ГХ, главным образом как метод разделения, благодаря быстрой, малым количествам вещества, необходимого для анализа, высокой разрешающей способности обладает большими достоин-

ствами при исследованиях в этой области. Нельзя закончить эту главу о ГХ, не упомянув о дальнейших возможностях ее применения. Так, в пептидной химии с ее помощью можно просто и быстро получить ответ на ряд вопросов. В качестве примера назовем раскрытие внутренних ангидридов N-ТФА-Глу и N-ТФА-Асп аминокислотами, при котором образуются изомерные пептиды в различных соотношениях [106, 114].

Большое значение приобрело разделение диастереоизомерных метиловых эфиров N-ТФА-дипептидов [115]. Его проводили коли-



Фиг. 81. Газовая хроматограмма частичного кислотного гидролизата не полностью рацемизованного тетрапептида Лей-Фен-Ала-Фен после этерификации и трифторацетилирования.

Стальной капилляр длиной 50 м содержит полифениловый эфир OS 138; 220°C; скорость потока N_2 — 2,1 мл/мин. 1 — L-Фен-L-Ала; 2 — L-Фен-D-Ала; 3 — L-Ала-L-Фен; 4 — D-Ала-L-Фен; 5 — L-Лей-L-Фен; 6 — L-Лей-D-Фен.

чественно в капиллярных колонках для большого числа пептидов различной последовательности [124]. Это разделение является первым точным и надежным методом определения рацемизации в пептидном синтезе. Наряду с разнообразными N-ацламинокислотами при изучении оптимальных условий различных реакций пептидного синтеза могут найти применение N-ацилпептиды, если синтезированные пептиды перед разделением диастереоизомеров подвергать частичному гидролизу [69, 124]. На фиг. 81 показана хроматограмма частичного кислотного гидролизата не полностью рацемизованного синтетического тетрапептида. В данных условиях, помимо аминокислот, были обнаружены только дипептиды, входящие в исходную последовательность. На фиг. 77 двойной пик тирозинового дипептида также свидетельствует о частичной рацемизации Тир. Из этого последнего примера видно, что в определенных случаях можно быстро и без затруднений контролировать и определять степень оптической чистоты пептидов.

Цитированная литература

1. Ackman R. G., *J. of Gas Chromatogr.*, **2**, 173—179 (1964).
2. Anders K., *Gas-Chromatographie*, pp. 1—22 (ed. Struppe H. G., Angelé H. P., Akademie Verlag, Berlin 1964), 1963.
3. Baraud J., *Bull. Soc. Chim. France*, 784 (1960).
4. Bayer E., Desty D. H., *Gas Chromatography*, p. 333, Butterworth, London, 1958.
5. Bayer E., Born F., Reuther K.-H., *Angew. Chem.*, **69**, 640 (1957).
6. Biemann K., Gapp F., Seibl J., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2274 (1959).
7. Biemann K., Vetter W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 578 (1960).
8. Bier M., Teitelbaum C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **72**, 641 (1959).
9. Birkofer L., Ritter A., *Chem. Ber.*, **93**, 424 (1950).
10. Blau K., Darbre A., *Biochem. J.*, **88**, 8P (1963).
11. Blau K., Darbre A., *J. Chromatogr.*, **17**, 445 (1965).
12. Boissonnas R. A., Guttman S., Huguenin R. L., Jaquenoud P. A., Sandrin E., *Helv. Chim. Acta*, **41**, 1867 (1958).
13. Brunnée C., Jenckel L., Kronenberger K., *Z. Anal. Chem.*, **197**, 42 (1963).
14. Calvin M., Schallenberg E., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2779 (1955).
15. Chibnall A. C., Mangan J. L., Rees M. W., *Biochem. J.*, **68**, 114 (1958).
16. Gruckshank P. A., Sheehan J. C., *Anal. Chem.*, **36**, 1191 (1964).
17. Darbre A., Личное сообщение.
18. Darbre A., Blau K., *Biochem. J.*, **88**, 8P (1963).
19. Darbre A., Blau K., *J. Chromatogr.*, **17**, 31 (1965).
20. Dorsey J. A., Hunt R. H., O'Neal M. J., *Anal. Chem.*, **35**, 511—515 (1963).
21. Eck R. V., *Nature*, **193**, 241 (1962).
22. Edman P., *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283 (1950).
23. Engelhardt K., Dissertation, Techn. Hochschule (Technical University), München, 1963.
24. Ettre L. S., *Open Tubular Columns in Gas Chromatography*, Plenum Press, New York, 1965.
25. Evans R. M., *Mfg. Chemists Assoc.*, **32**, 512 (1961).
26. Fischer E., *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **34**, 433 (1901).
27. Gehrke C. W., Lamkin W. M., *Chem. Eng. News*, **42**, Nr. 37, 62 (1964).
28. Giacobbo H., Simon W., *Pharm. Acta Helv.*, **39**, 162 (1964).
29. Graf J., Wein J. P., Winitz M., *Fed. Proc.*, **22**, Part I, 244 (1963).
30. Grassmann W., Hermann H., Janowsky O., *Z. Physiol. Chem.*, **312**, 273 (1958).
31. Greenstein J. P., Winitz M., *Chemistry of the Amino Acids*, John Wiley and Sons, New York, p. 925, 1961.
32. Hagen P., Black W., *Fed. Proc.*, **23**, 371 (1964).
33. Henneberg D., *Z. Anal. Chem.*, **183**, 12—23 (1961).
34. Heyns K., Grützmacher H. F., *Tetrahedron* 1761; *Liebings Ann. Chem.*, **669**, 189 (1963).
35. Hoffer D., Dissertation Techn. Hochschule (Technical University), München, 1962.
36. Horning E. C., Maddock K. C., Anthony K. V., van den Heuvel W. J. A., *Anal. Chem.*, **35**, 526 (1963).
37. Hunter I. R., Dimick K. P., Cobse J. W., *Chem. Inds*, 294 (1956).
38. Ikekawa N., *J. Biochem. (Japan)*, **54**, 279 (1963).
39. Ingram V. M., *Nature*, **178**, 792 (1956).
40. Ishii S., Witkop B., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1832 (1963).
41. Janak J., *Nature*, **185**, 685 (1960).
42. Johnson D. E., Scott S. J., Meister A., *Anal. Chem.*, **33**, 669 (1961).
43. Kaelicke J., Dissertation. Techn. Universität (Technical University), Berlin, 1958.
44. Kaiser R., *Chromatographie in der Gasphase. Bd. II. Kapillar-Chromatographie*. Bibliographisches Institut, Mannheim, 2nd ed., 1966.

45. *Kaiser R.*, Chromatographie in der Gasphase. Bd. III. Tables pp. 78—116, Bibliographisches Institut, Mannheim, 2nd ed., 1968.
46. *Kaiser R.*, *Z. Anal. Chem.*, **205**, 284—298 (1964).
47. *Kaiser R.*, Chromatographie in der Gasphase. Bd. I. Gas-Chromatographie, pp. 58—59, Bibliographisches Institut, Mannheim, 1965.
48. *Kaiser R.*, Chromatographie in der Gasphase. Bd. IV. Quantitative Auswertung. Bibliographisches Institut, Mannheim, 1965.
49. *Kaiser R.*, Chromatographie in der Gasphase. Bd. IV, pp. 26—52, Bibliographisches Institut, Mannheim, 1965.
50. *Karrer P., Nicolaus B. J. R.*, *Helv. Chim. Acta*, **35**, 1581 (1952).
51. *Karrer P., Portmann P., Suber M.*, *Helv. Chim. Acta*, **32**, 1156 (1949).
52. *Kováts E., Wehrli A.*, *Helv. Chim. Acta*, **42**, 2709 (1959).
53. *Lamkin W. M., Gehrke C. W.*, *Anal. Chem.*, **37**, 385 (1965).
54. *Landowne R. A., Lipsky S. R.*, *Nature*, **199**, 141 (1963).
55. *Langheld K.*, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **42**, 2360 (1909).
56. *Liberti A., Desty D. H.*, *Gas Chromatography*, Butterworth, London, p. 341, 1958.
57. *Lorette N. B., Brown J. H., Jr.*, *J. Org. Chem.*, **24**, 261 (1959).
58. *Losse G., Losse A., Stöck J.*, *Z. Naturforsch.*, **17b**, 785 (1962).
59. *Makisumi S., Nicholls C. H., Saroff H. A.*, *J. Chromatogr.*, **11**, 327 (1963).
60. *Makisumi S., Saroff H. A.*, *J. Gas Chromatogr.*, **3**, 21 (1965).
61. *McCaldin D. J.*, *Chem. Revs.*, **60**, 39 (1960).
62. *McLamed N., Renard R.*, *J. Chromatogr.*, **4**, 339 (1960).
63. *Meyer D. M., Jutisz M.*, *Bull. Soc. Chim. France*, 1211 (1957).
64. *Morita K., Irreverse F., Witkop B.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2832 (1963).
65. *Nicholls C. H., Makisumi S., Saroff H. A.*, *J. Chromatogr.*, **11**, 327 (1963).
66. *Pisano J. J., van der Heuvel W. J. A., Horning E. C.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 82 (1962).
67. *Prox A.*, Dissertation, Techn. Universität, Berlin, 1959.
68. *Prox A., Weygand F.*, in: *Peptides*, Proc. of the 8th Europ. Peptide-Sympos. Noordwijk, the Netherlands, Sept. 1966, ed. by Beyerman H. C., van de Linde A., van den Brink M., North Holland, p. 158, 1967.
69. *Prox A., Weygand F., König W., Schmidhammer L.*, Proceedings of the 6th Europ. Peptide-Symposium, Athens, 1963, Pergamon Press, Oxford, p. 139, 1966.
70. *Rühlmann K., Giesecke W.*, *Angew. chem.*, **73**, 113 (1961).
71. *Rühlmann K., Michael G.*, *Chem. Ber.*, **94**, 1876 (1961).
72. *Rühlmann K., Michael G.*, *Gas-Chromatographie*, pp. 221—229, 1963.
73. *Rühlmann K., Michael G.*, *J. Gas Chromatogr.*, **1**, 18 (1963).
74. *Ruttenberg M. A., King T. P., Craig L. C.*, *Biochem. J.*, **3**, 758 (1964).
75. *Ryhage R.*, *Anal. Chem.*, **36**, 759 (1964).
76. *Sanger F.*, *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
77. *Saroff H. A., Karmen A.*, *Anal. Biochem.*, **1**, 344 (1960).
78. *Saroff H. A., Karmen A., Healy J. A.*, *J. Chromatogr.*, **9**, 122 (1962).
79. *Shaw P. D.*, *Anal. Chem.*, **35**, 1580 (1963).
80. *Шелякин М. М., Овчинников Ю. А., Иванов В. Т. и Кирюшкин А. А.*, *Tetrahedron Letters*, **28**, 1927 (1963).
81. *Шляпников С. В., Карпейский М. Я., Литвин Е. Ф.*, *Биохимия*, **28**, 664; *Chem. Abstr.*, **59**, 14278 c (1963).
82. *Simmons H. E., Wiley D. W.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2288 (1960).
83. *Stalling D. L., Gille G., Gehrke C. W.*, *Anal. Biochem.*, **18**, 118 (1967).
84. *Steglich W., Austel V.*, *Chem. Ber.*, **100**, 547 (1967).
85. *Stenhagen E.*, *Z. Anal. Chem.*, **181**, 462 (1961).
86. *Stevenson J. M., Luck J. W.*, *J. Biol. Chem.*, **236**, 715 (1961).
87. *Tanner H.*, Dissertation, Techn. Hochschule (Technical University), München, 1963.
88. *Teuwissen B., Lenain C., Dorlet C., Leonis J.*, *J. Pharm. Belg.*, **88** (1963).

89. Ulehla J., Sbornik sčeskoslov. Akad. Zemědělské ved., Zivocisna vyhora, **5**, 567, (1960); Chem. Abstr., **55**, 5542 h. (1961).
90. Van den Heuvel W. J. A., Anal. Chem., **35**, 526 (1963).
91. Van den Heuvel W. J. A., Horning E. C., Anal. Chem., **36** (1964).
92. Virtanen A. I., Rautanen N., Suomen Kemistilehti, **19B**, 56; Chem. Abstr., **41**, 5566 (1946, 1947).
93. Витт С. В., Сопоровская М. Б., Беликов В. Н., Изв. АН Латв. ССР, хим. серия, 525 (1963).
94. Voss W., Blanke E., Liebigs Ann. Chem., **485**, 258 (1931).
95. Wagner J., Rausch G., Z. Anal. Chem., **194**, 350 (1963).
96. Wagner J., Winkler G., Z. Anal. Chem., **183**, 1 (1961).
97. Watson J. Th., Biemann K., Anal. Chem., **36**, 1135 (1964).
98. Weinstein B., Fenschau A. H., J. Chromatogr., **15**, 149 (1964).
99. Weygand F., Diskussionsbeitrag auf der GDCh-Hauptversammlung Berlin anlässlich eines Vortrags von F. Bayer am 9 Oktober (1957).
100. Weygand F., Z. Anal. Chem., **205**, 406 (1964).
101. Weygand F., Z. Anal. Chem., **205**, 413 (1964).
102. Weygand F., Burger K., Engelhardt K., Chem. Ber., **99**, 1461 (1966).
103. Weygand F., Csendes E., Angew. Chem., **64**, 136 (1952).
104. Weygand F., Eberhardt G., Angew. Chem., **64**, 458 (1952).
105. Weygand F., Eichner K., неопубликованные данные.
106. Weygand F., Fritz H., Chem. Ber., **98**, 72 (1965).
107. Weygand F., Geiger R., Chem. Ber., **89**, 647 (1956).
108. Weygand F., Geiger R., Swodenk W., Angew. Chem., **68**, 307 (1956).
109. Weygand F., Geiger R., Chem. Ber., **92**, 2099 (1959).
110. Weygand F., Glöckner U., Chem. Ber., **89**, 653 (1956).
111. Weygand F., Kaelicke J., неопубликованные данные.
112. Weygand F., Klinke P., Eigen I., Chem. Ber., **90**, 1896 (1957).
113. Weygand F., Klipping G., Palm D., Chem. Ber., **93**, 2619 (1960).
114. Weygand F., Kolb B., Kirchner P., Z. Anal. Chem., **181**, 396 (1961).
115. Weygand F., Kolb B., Prox A., Tilak M. A., Tomida I., Hoppe-Seylers, Z. Physiol. Chem., **322**, 38 (1960).
116. Weygand F., König W., Prox A., Burger K., Chem. Ber., **99**, 1443 (1966).
117. Weygand F., Leising E., Chem. Ber., **87**, 248 (1954).
118. Weygand F., Nintz E., неопубликованные данные.
119. Weygand F., Prox A., неопубликованные данные.
120. Weygand F., Prox A., Fessel H.-H., Sun K. K., Z. Naturforsch., **20b**, 1169 (1965).
121. Weygand F., Prox A., Jorgensen E. C., Axen R., Kirchner P., Z. Naturforsch., **186**, 93 (1963).
122. Weygand F., Prox A., König W., неопубликованные данные.
123. Weygand F., Prox A., König W., Fessel H.-H., Angew. Chem., **75**, 724 (1963).
124. Weygand F., Prox A., Schnidhammer L., König W., Angew. Chem., **75**, 282 (1963).
125. Weygand F., Reither M., Chem. Ber., **88**, 27 (1955).
126. Weygand F., Rinno H., Chem. Ber., **92**, 517 (1959).
127. Weygand F., Steglich W., Tanner H., Liebigs Ann. Chem., **658**, 128 (1962).
128. Winter L. N., Albro P. W., J. Gas-Chromatogr., **2**, 1 (1964).
129. Youngs C. G., Anal. Chem., **31**, 1019 (1959).
130. Zlatkis A., Oro J. F., Kimbal A. P., Anal. Chem., **32**, 162 (1960).
131. Zomzely G., Marco G., Emery E., Anal. Chem., **34**, 1414 (1962).

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агар, очистка 127
Агаровая пластинка 138
— — количественное определение
белкового антигена 159
Агаровый гель, приготовление 127
Адьювант 116
— Фрейнда 118
Азокармин, окрашивание 136
Амберлит IR-4В, приготовление
колонок 195
Амидовый черный, окрашивание 48,
136
— — очистка 54
Аминокислотные анализаторы 173
— — аппаратура 174, 184
— — буферные растворы 175
— — выбор аналитического мето-
да 173, 179
Аминокислоты, газовая хромато-
графия 328
— дансил 237
— количественное определение
173
— одномерное разделение 255
— основные, определение на ма-
лой колонке 184
— пиролиз 327
— получение производных 309,
324
— производные для газовой хро-
матографии 312
— разделение ароматических и
основных 250
— хроматография на бумаге 187,
191
— — — микропрепаративная
191
Аминополипептидаза 39
Анализ концевых групп 265
Антигены 15
— серийные разведения 121
Антиген—антитело, определение
зоны эквивалентности 123
Антитела 15
— определение титра 121
Аппарат для электрофореза в крах-
мальном блоке 83
Аргинин, определение 193
Ацетон-нингидриновый раствор 99
N-ацилпроизводные, определение
194
Белки, гель-фильтрация 220
— гидролиз 165
— — кислотный 166
— — — частичный 167
— — папанином 170
— — пепсином 169
— — трипсином 168
— — химотрипсином 169
— гомогенность 31
— динитрофенилирование 266
— С-концевая последователь-
ность, см. С-концевая последо-
вательность
— концентрирование 27, 211
— — с помощью сефадекса 221
— окрашивание 54
— определение молекулярного ве-
са 238
— расщепление бромцианом 170
— спектрофотометрическое опре-
деление 66
— сравнительный анализ по Ос-
серману 149
— сыворотки крови, иммуноэлек-
трофоретическая характери-
стика 144
— — — фракционирование гель-
фильтрацией 222
— — — — на колонке с ДЭАЭ-
сефадексом 215
— — — — — с КМ-целлюло-
зой 215
— — — — — с фосфоцеллюло-
зой 214
— хроматография, см. Хромато-
графия
Белковые растворы, обессолива-
ние 27, 220
Биогели 24
— типы 25
N-бромсукцинимид 36

- Бромциан, расщепление 37, 170
 Буферный раствор Михаэлиса 138
- Восстановление** 34, 166
- Газовый денситометр** 299
Газохроматографический анализ
 294—296, 299
 — — пептидов 337
 — — — по Биману 339
 — — — по Вейганду 341
 — — производных аминокислот 328
Гамма-глобулин, выделение с помощью ДЭАЭ-сефадекса 218
 — гель-фильтрация фрагментов 223
 — — — выбор колонки 224
Гель-фильтрация 23
 — иммунная 152, 240
 — непрерывная 228
 — тонкослойная 153, 238
Гель-электрофорез в крахмальном геле, вертикальный 78
 — — — горизонтальный 80
Гель-электрофоретические приборы 88
Гидразинолиз пептидов 290
Гидролиз, кислотный частичный 34, 167
 — специфическими ферментами 35
 — щелочной 199
Гидролизаты, анализ 179, 184
Гидроокись алюминия, приготовление геля 119
Гликопротеиды, окрашивание 58
Глицин, определение 194
Градиент концентрации антител 157
Градиентное элюирование 22
SH-группы, окисление 33
- Дансильрование** 275
Дансильный метод 39, 274
 — вариант метода Эдмана 284
Дауэкс 50 × 2, приготовление смолы 198, 199
Дегидрогеназы 42
Детектор теплопроводности 299
Диализ под давлением 27, 211
Диспротеинемия 9
ДНС-аминокислоты, идентификация 275
 — — методом электрофореза на бумаге 276
ДНС-аминокислоты, идентификация
 методом электрофореза в тонком слое 277
 — — тонкослойной хроматографией на полиамидных пластинках 279
ДНФ-аминокислоты 325, 271, 273
 — идентификация тонкослойной хроматографией 270
 — количественное определение 272
 — хроматография на бумаге 268
ДНФ-белки, гидролиз 267
ε-ДНФ-лизин, приготовление 274
ДНФ-пептиды, гидролиз 267
Дозатор 297
 — ввод образца 303
ДЭАЭ-целлюлоза в OH⁻-форме 204
 — — Cl⁻-форме 205
 — обработка 202, 204
- Жидкие фазы для ГХ-анализа** 306
Жировой красный, окрашивание 136
- Иммунизация без адъювантов** 116
 — с адъювантами 116, 118
Имунная сыворотка 16
 — — получение 116
Иммунодиффузия 18
 — двойная 19
 — на ацетат-целлюлозных мембранах 161
Иммуноэлектрофорез 19, 137
 — абсорбционный 150
 — количественный 161
Ионообменная хроматография в фиксированном слое ионообменника 242
 — — на полимерах декстрана (сефадексах) 21
 — — пептидов 195
 — целлюлоза 21
Источник тока 46
- Кадмий-нингидрин** 193
Камера Даррема 49
 — Канкеля—Тизелиуса 49
 — «Элфор» 50
Карбоксиметилирование 166
Карбоксипептидаза 39
 — предварительная обработка 292
 — расщепление белков 291, 292
КМ-метионин в пептидах 109

- КМ-целлюлоза 200
 — обработка 200, 212
 Картофельный крахмал, гидролиз 81
 Коллидин-нингидрин 193
 N-концевая последовательность 39
 — — определение 265, 281
 С-концевая последовательность 39
 — — из триптического гидролизата белков 113
 Крахмальный гель, приготовление 78
 Крупнопористый гель 92
- Лейцинаминопептидаза 288
 — деградация белка 290
 — определение активности 289
 Летучие буферные растворы 199
 Лизин, определение содержания 251, 258
 Липопротены, окрашивание 57
- Макрометод иммуноэлектрофореза 137, 138
 Маленирование 36, 112
 Мелкопористый гель 91
 Метионин, выделение диагональным электрофорезом 108
 — определение 184, 258
 Метод диффузии в геле 127
 — — — двойной линейной 129
 — — — — двумерной двойной 131
 — — — — количественный 157
 — — — — простой линейной 127
 — «истощения» 150
 — «отпечатков пальцев» 96, 103
 — ползетиленовой пленки 189
 Микроиммуноэлектрофорез 170
 S — S-мостики 33
- Надмуравьиная кислота, окисление 33, 165, 262
 Неспецифическое ферментативное расщепление, методы 35
 Нигрозин, окрашивание 73
 Нингидриновая реакция 69
- Одноколоночный метод, заполнение колонки 177
 Окрашивание амидовым черным, см. Амидовый черный
- Окрашивание белков 54
 — — азокармином 56
 — — амидовым черным 54, 76
 — — бромфеноловым синим 56
 — — кислым фуксином 55
 — — пунцовым красным 56
 — гаптоглобина 146
 — гликопротеидов 58, 145
 — — иодной кислотой — реактивом Шиффа 59
 — — по Зюдхофу 59
 — — толудиновым синим 58
 — жировым красным, см. Жировой красный
 — кислым фуксином 136
 — липопротендов 56
 — — жировым красным 57
 — — суданом черным 57, 76
 — нигрозином, см. Нигрозин
 — по Пукару 55
 — пунцовым S, см. Пунцовый S
 — сосуды 46
 — суданом черным, см. Судан черный
 — церулоплазмине 145
 Оксипролин, определение 193
 Определение содержания белка 66
 — — — амидовым черным 70
 — — — биуретовой реакцией 69
 — — — нингидриновой реакцией 69
 — — — фенольным реактивом Фолина — Чокальтеу 67
 Очистка HCl 166
- Папаин, активация 170
 — гидролиз 170
 Парапротенизм 10
 Пепсин, гидролиз 169
 Пептидная карта 237
 Пептиды, гидролиз 165
 — — кислотный 166, 167
 — — ферментативный 168, 169, 170
 — деградация фенилизотиоцианатом 39
 — ионообменная хроматография 195
 — кислые, фракционирование 195
 — основные, хроматография 196
 — препаративное выделение 99
 — содержащие гистидин, выделение диагональным электрофорезом 110

- Пептиды, содержащие лизин, выделение диагональным электрофорезом 111
- — цистеин 42
 - хроматография, см. Хроматография
 - эстераз, содержащие серин 42
- Пламенно-ионизационный детектор 299
- Пластины «Фиксион» 244
- — анионообменная хроматография 261
 - — нанесение проб 247
 - — применение 244, 250
 - — проявление 249
- Полиакриламидный гель 24
- Полиамидные слои 237
- Последовательность аминокислот 31
- — принцип анализа 32
- Прием «прививания» 96
- Пролин, определение 193
- Проявление хроматограммы 234
- Пунцовый S, окрашивание 73, 136
- Радиоиммуноэлектрофорез 148
- Рацемизация в пептидном синтезе, определение 261
- Реакция кольцепреципитации 123
- Паули 193
 - преципитации 16
 - — качественная 119
 - — количественная 125
 - — по Ухтерлони 132
 - Сакагуши 193
- Сефадексы, типы 25
- Силикагель 235
- фракционирование ДНФ-аминокислот 235
- Смолы со сферическими частицами 174
- Специфическое химическое расщепление 36
- Ступенчатая деградация 265
- Ступенчатое элюирование 22
- Судан черный, ацелирование 58
- — окрашивание 57, 136
- Сульфитолиз 34
- Сыворотка крови 178
- Тирозин, определение 194
- Титр 19
- Трипсин 35
- гидролиз 168
 - предварительная очистка 168
 - специфичность 35
- Триптофан, определение 194, 259
- Трифторацетилирование 36, 111
- Фенилизотиоцианат 281
- Фиксированный слой ионообменника 242
- — — разделение аминокислот 255
- ФТГ-аминокислоты 236
- идентификация 286
 - приготовление 286
- Химотрипсин 36
- Хроматографическая камера 187
- Хроматография белков 204, 209, 212
- бумажная 38
 - в мочевице на ДЭАЭ-целлюлозе 207
 - восходящая 188
 - выбор бумаги 188
 - газовая 294
 - длительная 223
 - ионообменная в фиксированном слое 242, 261
 - — — ферментативных гидролизатов 257
 - катионообменная на КМ-сефадексе 217
 - микропрепаративная 191
 - на агарозном геле 25
 - нисходящая 188
 - пептидов 200
 - тонкослойная 231, 270, 279
 - — аминокислот 234
- Целлюлозный слой 234
- Цистеин, быстрое определение 262
- окисление 33
- Цистин, быстрое определение 262
- окисление 33
- Цитраконилирование 112
- Электроосмос 52
- Электросинерез 154
- Электрофорез в агаровом геле 13, 74
- в геле агарозы, содержащем антитела 154
 - в крахмальном геле 12, 78
 - — — содержащем мочевицу 82
 - в полиакриламидном геле 14, 84

- Электрофорез в полиакриламидном геле, содержащем мочевины 92
- в целлогеле 73
 - выбор бумаги 188
 - высоковольтный 113
 - — аппараты 95
 - диагональный 96, 106
 - — для пептидов, содержащих цистин 106
 - диск 88
 - зональный 10
 - на ацетат-целлюлозной мембране 14, 71
- Электрофорез на бумаге 12, 37, 95
- — — буферные растворы 50
 - — — в двойной буферной системе 100
 - низковольтный 46
 - препаративный в крахмальном блоке 83
 - приборы 46, 83, 88
 - с подвижной границей 9
 - «Элфор—Транспавак»-приспособление 65
- Эстеразы, содержащие серин 42

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие авторов	6
 ГЛАВА I. НЕКОТОРЫЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ АНАЛИТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ	7
А. Изучение нативных белков	7
1. Электрофорез нативных белков	8
2. Метод зонального электрофореза	10
3. Изучение нативных белков иммунохимическими методами	15
4. Ионообменная хроматография белков	21
5. Фракционирование белков с помощью гель-фильтрации	23
6. Мембранная фильтрация	27
Цитированная литература	30
Рекомендуемая литература	30
Б. Методологические вопросы анализа аминокислотной последо- вательности белков	31
Цитированная литература	43
Рекомендуемая литература	45
 ГЛАВА II. АНАЛИЗ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ НИЗКОВОЛЬТНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА	46
А. Низковольтный электрофорез на бумаге	46
1. Техника проведения электрофореза	46
2. Методики окрашивания	54
3. Количественная оценка результатов разделения белков при низковольтном электрофорезе на бумаге	60
4. Некоторые источники ошибок при проведении низковольт- ного электрофореза на бумаге	66
5. Определение содержания белка	66
Б. Электрофорез на ацетат-целлюлозной мембране	71
В. Электрофорез в агаровом геле	74
Приборы	74
Методика	74
Г. Электрофорез в крахмальном геле	78
1. Вертикальный электрофорез в крахмальном геле	78
2. Горизонтальный электрофорез в крахмальном геле	80
Д. Электрофорез в полиакриламидном геле	84
1. Зональный электрофорез в полиакриламидном геле	84
2. Диск-электрофорез	88
Цитированная литература	93
Рекомендуемая литература	93

ГЛАВА III. МЕТОДЫ СРЕДНЕ- И ВЫСОКОВОЛЬТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (М. ШАЙГО)	95
А. Аппарат для средневольтного горизонтального электрофореза и его использование	96
Б. Метод диагонального электрофореза	106
1. Выделение пептидов, содержащих цистин	106
2. Выделение пептидов, содержащих метионин	108
3. Выделение пептидов, содержащих гистидин	110
4. Выделение пептидов, содержащих лизин	111
5. Выделение С-концевого пептида из триптического гидроли- зата белков	113
В. Метод высоковольтного электрофореза	113
Цитированная литература	115
Рекомендуемая литература	115
ГЛАВА IV. МЕТОДЫ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	116
А. Получение иммунной сыворотки	116
1. Схемы иммунизации без адьюванта	116
2. Схемы иммунизации с адьювантами	118
Б. Анализ белков с помощью реакции преципитации	119
1. Качественная реакция преципитации	119
2. Определение титра преципитирующих антител по разведе- нию антигена	121
3. Определение зоны эквивалентности реакции антиген—ан- титело	123
4. Реакция кольцепреципитации (реакция преципитации на границе слоев, содержащих антиген и антитела)	123
5. Количественная реакция преципитации по Хайдельберге- ру	125
В. Анализ белков методами диффузии в геле	127
1. Метод простой линейной диффузии в геле по Удену	127
2. Метод двойной (одномерной) линейной диффузии в геле	129
3. Метод двумерной двойной диффузии в геле по Ухтерлони	131
4. Иммуноэлектрофорез	137
5. Сравнительный анализ белков по Оссерману	149
6. Абсорбционный иммуноэлектрофорез	150
7. Иммунная гель-фильтрация	152
8. Электросиерез	154
9. Качественный и количественный анализ белков с помощью электрофореза в геле агарозы, содержащем антитела	154
10. Количественные методы иммунодиффузии	157
11. Иммунодиффузионный анализ белков на ацетат-целлюлоз- ных мембранах	161
Цитированная литература	163
Рекомендуемая литература	163
ГЛАВА V. ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ	165
А. Подготовка исследуемого материала для гидролиза	165
1. Окисление белков и пептидов надмуравьиной кислотой	165
2. Восстановление и карбоксилирование белков и пептидов	166
Б. Гидролиз белков и пептидов в 6 н. HCl	166
В. Частичный кислотный гидролиз белков и пептидов	167
Г. Гидролиз белков и пептидов трипсином	168
Д. Гидролиз белков и пептидов химотрипсином	169
Е. Гидролиз белков и пептидов пепсином	169
Ж. Гидролиз белков и пептидов папаином	170

3. Расщепление белков бромцианом	170
Рекомендуемая литература	172
ГЛАВА VI. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ	173
Цитированная литература	186
ГЛАВА VII. ХРОМАТОГРАФИЯ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ НА БУМАГЕ	187
Рекомендуемая литература	194
ГЛАВА VIII. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПЕПТИДОВ	195
А. Фракционирование кислых пептидов на колонке с амберлитом IR-4B	195
Б. Хроматография основных пептидов на колонке с амберлитом IRC-50	196
В. Фракционирование пептидов на колонке с дауэксом 50 × 2 в нелетучих буферных растворах	197
Г. Фракционирование пептидов на колонке с дауэксом 50 × 2 в летучих буферных растворах	199
Д. Хроматография пептидов на колонке с КМ-целлюлозой	200
Е. Хроматография пептидов на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	202
Рекомендуемая литература	203
ГЛАВА IX. ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ	204
А. Хроматография белков на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	204
1. Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в ОН ⁻ -форме	204
2. ДЭАЭ-целлюлоза в Cl ⁻ -форме	205
3. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе в присутствии мочевины	207
Рекомендуемая литература	208
4. Хроматография белков сыворотки на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	209
Б. Хроматография белков на колонке с катионообменной целлюлозой	212
1. КМ-целлюлоза	212
2. Фракционирование белков сыворотки крови на колонке с фосфоцеллюлозой	214
3. Фракционирование белков сыворотки крови на колонке с КМ-целлюлозой	215
В. Фракционирование белков сыворотки на колонке с ДЭАЭ-сефадексом	215
Г. Выделение IgG из сыворотки крови с помощью бесколоночного фракционирования на ДЭАЭ-сефадексе	218
Рекомендуемая литература	219
ГЛАВА X. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ	
А. Обессоливание белковых растворов на колонке с сефадексом	220
Б. Концентрирование белковых растворов с помощью сефадекса	221
В. Фракционирование белков сыворотки гель-фильтрацией	222
Г. Разделение высокомолекулярных фрагментов гель-фильтрацией на колонке с сефадексом	223
Д. Предварительное фракционирование ферментативных гидролизатов на колонке с сефадексом G-50	226

Е. Разделение белков непрерывно повторяющейся гель-фильтрацией	228
Рекомендуемая литература	230
ГЛАВА XI. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (Д. А. МЕДЬЕШИ)	231
А. Тонкослойная хроматография аминокислот и их производных	234
1. ДНФ-аминокислоты	235
2. ФТГ-аминокислоты	236
3. Дансилааминокислоты	237
4. Пептиды	237
Б. Тонкослойная гель-фильтрация	238
Цитированная литература	241
Рекомендуемая литература	241
ГЛАВА XII. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В ФИКСИРОВАННОМ СЛОЕ ИОНООБМЕННИКА	242
Типы пластинок «Фиксион»	244
Применение пластинок «Фиксион 50 × 8»	244
Уравновешивание пластинок «Фиксион 50 × 8»	246
Нанесение проб	247
Приготовление раствора нингидрина	248
Области применения	250
Разделение ароматических и основных аминокислот	250
Анионообменная хроматография на пластинке «Фиксион»	261
Быстрое определение цистеина и цистина в форме цистеиновой кислоты в образцах растительного происхождения	262
Цитированная литература	264
ГЛАВА XIII. АНАЛИЗ КОНЦЕВЫХ ГРУПП И СТУПЕНЧАТАЯ ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ	265
А. Определение N-концевых групп 2,4-динитрофторбензольным методом	265
1. Динитрофенилирование белков	266
2. Гидролиз ДНФ-белка или ДНФ-пептида и экстракция ДНФ-производных	267
3. Хроматография на бумаге ДНФ-аминокислот	268
4. Идентификация ДНФ-аминокислот тонкослойной хроматографией	270
5. Непрямая идентификация ДНФ-аминокислот	271
6. Количественное определение ДНФ-производных	272
7. Приготовление ДНФ-аминокислот	273
8. Приготовление ε-ДНФ-лизина	274
Б. Определение N-концевых аминокислот дансильным методом	274
Методика	275
Приготовление ДНС-аминокислот	281
В. Определение N-концевой аминокислотной последовательности в реакции с фенилизотиоцианатом	281
Г. Дегградация белков с помощью ФТЦ	283
Д. Анализ последовательности аминокислот в пептидах методом Эдмана в дансильном варианте	284
Е. Определение последовательности аминокислот в пептидах дегградацией по Эдману и количественным аминокислотным анализом	285
1. Идентификация и определение ФТГ-производных	286

2. Приготовление ФТГ-аминокислот	286
Ж. Определение N-концевой последовательности с помощью лей- циаминопептидазы	287
3. Определение C-концов гидразинолизом	290
И. Определение C-концевой последовательности аминокислот с помощью карбоксипептидазы	291
Цитированная литература	293
ГЛАВА XIV. ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНО- КИСЛОТ. СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ. ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕ- НИЯ МЕТОДА (Р. Кайзер и А. Прокс)	
Введение	294
Принцип метода	295
Методика	296
Специальные требования к приборам и экспериментальные усло- вия ГХ-анализа производных аминокислот и пептидов	302
Газовые хроматографы для аминокислотного анализа и тре- бования, предъявляемые к ним	306
Количественная оценка газовых хроматограмм	307
Свойства производных аминокислот	309
Получение производных аминокислот	309
Получение производных аминокислот путем защиты функ- циональных групп	311
Образование производных при химическом превращении аминокислот	324
Образование производных при деградации аминокислот	326
Пиролиз аминокислот	327
Газовая хроматография производных аминокислот	328
Проблемы количественного анализа аминокислот	335
Газовая хроматография пептидов	337
Метод Бимана и др.	339
Метод Вейганда и др.	341
Цитированная литература	352
Предметный указатель	355

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении,
качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820. Москва, И-110, ГСП
1-й Рижский пер., д. 2, издательство
«Мир»

Т. Дэвени, Я. Гёргей

АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ

Редактор Т. И. Жилиева

Художник М. Мержневский

Художественный редактор Ю. Урманчеев

Технический редактор Л. Бирюкова

Корректоры Е. К. Литвак, Т. И. Стифеева

Сдано в набор 19/VI 1975 г. Подписано к печати 6/II

1976 г. Бумага кн. журн. 60×90¹/₁₆ = 11,50 бум. л.

Усл. печ. л. 23 Уч.-изд. л. 22,70 Изд. № 4/8357

Цена 1 р. 78 к. Зак. 439.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., 2

Ярославский полиграфкомбинат «Союзполиграфпрома»
при Государственном комитете Совета Министров
СССР по делам издательств, полиграфии и книжной
торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Выйдут в свет в 1976 году

МИЛЛЕР ДЖ. Эксперименты в молекулярной генетике. Перевод с английского, 32 изд. листа.

Методическое руководство по молекулярной генетике и генетике бактерий и фагов, в котором описаны практически все методы и приемы, необходимые экспериментатору. Методы расположены в порядке возрастающей трудности; почти все они могут быть использованы при изучении самых разнообразных систем у широкого круга бактерий и фагов. Многочисленные иллюстрации и наглядные схемы облегчают воспроизведение предлагаемых методов. Подробная библиография дает возможность в случае необходимости найти оригинальное описание того или иного метода.

Предназначена для биологов различных специальностей (генетиков, вирусологов, биохимиков, цитологов, молекулярных биологов), для студентов старших курсов и аспирантов соответствующих кафедр.

УИЛЬЯМС В., УИЛЬЯМС Х. **Физическая химия для биологов.** Перевод с английского, 40 изд. листов.

Книга поможет удовлетворить настоящую потребность в современном учебнике физической химии для биологов. Написанная ярким и образным языком, с большим количеством иллюстраций, она может вместе с тем служить образцом точности и научной строгости. Изложены основные сведения по химической термодинамике, кинетике, электрохимии, коллоидной химии, теории растворов и другим разделам физической химии. Приведены примеры практического использования принципов и методов физической химии для решения конкретных биологических задач.

Предназначена для студентов, аспирантов и преподавателей биологических факультетов университетов, педагогических, сельскохозяйственных и медицинских институтов, а также для научных работников — биологов и медиков.

Отсканировал Семенюченко Владимир
chem_vova@mail.univ.kiev.ua
vova2002@mail.ru